

**Funktionelle Charakterisierung und prognostische  
Bedeutung von Dectin-1-Varianten für das  
Auftreten infektiologischer Komplikationen bei  
Patienten mit akuter myeloischer Leukämie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von M.Sc. Mike Fischer**

**geboren am 26.02.1987 in Meiningen**

## Gutachter

1. PD Dr. med. habil. Sebastian Scholl (Jena)
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Frank-Dietmar Böhmer (Jena)
3. Prof. Dr. med. Uwe Platzbecker (Dresden)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 5. Dezember 2017

## Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
AML	Akute myeloische Leukämie
ATRA	all-trans-retinoic acid
CARD9	Caspase recruitment domain-containing protein 9
CLEC7A	C-type lectin domain family 7 member A
CRD	carbohydrate recognition domain
CTLR	C-Type lectin-like receptors
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
Dectin-1	Dendritic cell-associated C-type lectin 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EORTC/ MSG	European Organisation for Research and Treatment of Cancer / Mycoses Study Group
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk1/2	extracellular signal-regulated kinases 1/2
FAB	French-American-British
gDNA	genomische DNA
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie (transformiert mit DNA des Adenovirus 5)
IA	Invasive Aspergillose
IPI	Invasive Pilzinfektionen
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kDa	Kilodalton
MBL-2	Mannose-bindendes Lektin 2
mRNA	messenger RNA
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
p38	p38 mitogen-activated protein kinase
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC $\delta$	Proteinkinase C, Isoform $\delta$
PLC $\gamma$ 2	Phospholipase-C, Isoform $\gamma$ 2
PRR	Pattern Recognition Receptor

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, reactive oxygen species
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Stalk-Region	Halsregion oder Stielregion
Syk	spleen tyrosine kinase
TF	Transkriptionsfaktor
THP-1	humane monozytäre Zelllinie (abgeleitet aus einem Patienten mit akuter monozytärer Leukämie)
TLR2	Toll-like-Rezeptor 2
WHO	World Health Organization

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>6</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>9</b>
2.1 Die angeborene Immunität.....	9
2.2 Akute myeloische Leukämie (AML).....	11
2.2.1 Inzidenz und Ätiologie .....	11
2.2.2 Klinisches Bild und Verlauf.....	12
2.2.3 Diagnostik und Klassifikation.....	12
2.2.4 Therapie.....	12
2.3 Invasive Pilzinfektionen bei Patienten mit AML.....	13
2.3.1 Erreger und Krankheitsbilder .....	14
2.3.2 Exogene Risikofaktoren .....	14
2.3.3 Genetische Risikofaktoren .....	15
2.4 Dectin-1 .....	15
2.4.1 Signaltransduktion .....	16
2.4.2 Proteinisoformen .....	19
2.4.3 Klinische Bedeutung von Dectin-1-SNPs .....	20
2.4.4 Toll-like-Rezeptor 2 und Dectin-1.....	21
<b>3 Zielstellungen der Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>4 Publierte Originalarbeiten .....</b>	<b>23</b>
4.1 Publikation I.....	23
<b>Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 Predispose to Invasive Fungal Disease in Patients with Acute Myeloid Leukemia.</b> Fischer, M., B. Spies-Weisshart, K. Schrenk, B. Gruhn, S. Wittig, A. Glaser, A. Hochhaus, S. Scholl and U. Schnetzke. PLoS One 11(3): e0150632. DOI: 10.1371/journal.pone.0150632 (2016).	
4.2 Publikation II .....	24
<b>Isoform localization of Dectin-1 regulates the signaling quality of anti-fungal immunity.</b> Fischer, M., J. P. Muller, B. Spies-Weisshart, C. Grafe, O. Kurzai, K. Hunniger, A. Hochhaus, S. Scholl and U. Schnetzke. Eur. J. Immunol., 47(5): 848–859. DOI:10.1002/eji.201646849 (2017).	
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>25</b>
<b>6 Schlussfolgerungen .....</b>	<b>35</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>37</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>43</b>
Abbildungen.....	43
Ehrenwörtliche Erklärung.....	44
Lebenslauf.....	45
Danksagung.....	48

# 1 Zusammenfassung

Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) weisen in der Regel ein deutlich geschwächtes Immunsystem auf und sind daher anfällig für lebensbedrohliche Infektionen. Dies ist zum einen durch die Erkrankung selbst bedingt, da es zu einer Verdrängung der physiologischen Hämatopoese durch Myeloblasten im Knochenmark kommt. Zum anderen führt die intensive Chemotherapie zu einem über mehrere Wochen andauernden Fehlen von Abwehrzellen. Invasive Pilzinfektionen (IPI), vor allem in der Lunge, stellen bei AML-Patienten aufgrund ihres gehäufteten Vorkommens ein besonderes Problem dar. Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und können Krankheitserreger anhand spezifischer Oberflächenstrukturen erkennen und eine Immunantwort einleiten. Der PRR Dectin-1 wird vorrangig auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert und ist für die Erkennung und Abwehr von Pilzen über die Bindung von  $\beta$ -Glucanstrukturen in deren Zellwand beteiligt. Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) im Dectin-1-Gen sind mit einer erhöhten Infektionsanfälligkeit vergesellschaftet. Der am häufigsten untersuchte SNP (Y238X, rs16910526) führt zu einer verkürzten Molekülvariante. Intronisch gelegene SNPs (rs7309123 und rs3901533) zeigen ebenso eine Korrelation mit der Anfälligkeit für IPI, obgleich Zusammenhänge mit der Funktion von Dectin-1 bisher nicht bewiesen worden sind. Auch für andere PRRs, wie den Toll-like-Rezeptor-2 (TLR2), sind Polymorphismen beschrieben, welche mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergehen. Für Dectin-1 und TLR2 konnte eine enge Kollaboration hinsichtlich der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion sowie Induktion der Expression inflammatorischer Zytokine gezeigt werden. Neben genetischen Variationen von Dectin-1 existieren insgesamt 8 Proteinisoformen, wobei nur Isoform A und B als funktionell relevante Plasmamembranrezeptoren beschrieben werden. Dectin-1A verfügt zusätzlich über eine 46 AS lange, extrazellulär lokalisierte und N-glykosylierte Halsregion zwischen der  $\beta$ -Glucanerkenntnis- und Transmembrandomäne. Die Unterschiede der zellbiologischen Funktionen zwischen Dectin-1A und -B sind bislang nicht vollständig untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

Im klinischen Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Dectin-1-SNPs sowie eines TLR2-SNP für das Auftreten invasiver Pilzinfektionen nach intensiver Chemotherapie bei 186 AML-Patienten untersucht. Die Patienten wurden am Universitätsklinikum Jena

behandelt und erhielten eine einheitliche Induktionschemotherapie. Es erfolgte eine Genotypisierung der Dectin-1-SNPs rs16910526 (Y238X), rs3901533 und rs7309123 sowie des TLR2-SNPs rs5743708 (R753Q) mittels eines TaqMan-PCR-basierten Verfahrens. Die Korrelation des Genotyps mit dem Auftreten von Pilzpneumonien erfolgte entsprechend der EORTC-/MSG-Diagnosekriterien (European Organisation for Research and Treatment of Cancer / Mycoses Study Group). Es konnte gezeigt werden, dass homo- sowie auch heterozygote Träger des G Allels von Dectin-1 rs7309123 (n = 133) ein signifikant erhöhtes Risiko für die Ausprägung einer Pneumonie generell (OR: 3.0; p = 0.004) sowie einer IPI (OR: 2.5; p = 0.041) aufweisen. Träger von TLR2 R753Q (GA oder AA Genotyp, n = 12) zeigten ebenfalls eine höhere Anfälligkeit für Pneumonien, inklusive IPI. In einem zweiten Abschnitt wurden die beiden Dectin-1-Isoformen A und B zellbiologisch charakterisiert. An primären humanen Monozyten zeigt sich eine selektive Hochregulation von Isoform B im Verlauf der Zelldifferenzierung zu Makrophagen und dendritischen Zellen und gibt einen Hinweis auf mögliche spezifische zellbiologische Funktionen der Isoformen. Es erfolgte zunächst die Etablierung spezifischer Zellkulturmodelle für Dectin-1A und -B über eine stabile genetische Integration der jeweiligen Transkriptvariante mittels einer retroviral-vermittelten Transduktion. Untersucht wurden das  $\beta$ -Glucan-Bindungsvermögen, die zelluläre Lokalisation sowie eine mögliche differenzielle Signaltransduktion und Zytokinsekretion der beiden Rezeptorvarianten. In den transduzierten Zelllinien THP-1 und HEK293 zeigte sich eine deutlich stärkere Präsenz von Isoform A in der Plasmazellmembran, verglichen mit Isoform B, welche vorrangig intrazellulär exprimiert wurde. In pharmakologischen Experimenten mit Tunicamycin konnte demonstriert werden, dass die zusätzliche Glykosylierung, welche spezifisch für Isoform A ist, deren Transport in die Plasmazellmembran erheblich begünstigt. Weiterhin führte Isoform A zu einer stärkeren Aktivierung der nachgeschalteten Proteinkinasen Syk,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , p38, Raf-1 und Erk1/2. Demgegenüber stand eine spezifische Induktion von IL-6 durch Isoform B. Zusammenfassend können die durchgeführten Untersuchungen von Polymorphismen des Dectin-1-Gens im Rahmen des AML-Patientenkollektivs zu einer besseren Risikostratifizierung bezüglich des Auftretens von invasiven Pilzinfektionen bei hämatologischen Patienten beitragen. In den Zellkulturmodellen konnten signifikante Unterschiede in der zellulären Lokalisation der Dectin-1-Isoformen A und B nachgewiesen werden, welche direkt mit dem Glykosylierungsstatus des Rezeptors zusammenhängen. Die beobachtete differenzielle Zytokinsekretion trägt zu einem

weiteren Verständnis der biologischen Funktion von Dectin-1 Rezeptorvarianten bei. So besitzt Isoform B möglicherweise eine spezifische Rolle in der Induktion von IL-6 und einer damit verbundenen Aktivierung von T-Lymphozyten.



## 2 Einleitung

Vertebraten sind oft Angriffen durch eine Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt und haben mit der Herausbildung des Immunsystems im Laufe ihrer Evolution einen effizienten Abwehrmechanismus entwickelt, um sich gegenüber körperfremden Stoffen bzw. Krankheitserregern zu verteidigen. Dabei werden zwei grundlegend verschiedene und sich gegenseitig ergänzende Mechanismen der körpereigenen Abwehr unterschieden. Zum einen gibt es die angeborene Immunabwehr, die auch als unspezifische Abwehr bezeichnet wird. Diese besteht aus keimbahnkodierten Rezeptoren und Proteinen und ist daher nicht veränderlich. Im Gegensatz dazu gibt es die adaptive Immunabwehr, welche durch eine dynamische Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern charakterisiert ist. Dies wird im Wesentlichen durch die zufällige Rekombination von Gensegmenten in Lymphozyten realisiert und bringt, im Zusammenspiel mit einem fein abgestimmten Selektionsapparat, ein großes und anpassungsfähiges Repertoire an Immunrezeptoren hervor. Dennoch bildet die angeborene Immunität, auf Grundlage ihrer schnellen Reaktionsfähigkeit bzw. ihrer Unabhängigkeit von einer vergleichsweise langsam ablaufenden klonalen Expansion von antigenspezifischen Lymphozyten, die initiale Verteidigungslinie für die Abwehr von Krankheitserregern.

### 2.1 Die angeborene Immunität

Den ersten wichtigen Schutz gegen Mikroorganismen bilden zunächst die Oberflächenepithelien des menschlichen Körpers. Hierzu zählen im Wesentlichen die Haut und der mukoziliäre Apparat des Atmungstrakts. Hinzu kommen physiologische Barrieren wie der niedrige pH-Wert des Magens, bakteriolytische Lysosomen in Tränenflüssigkeit, Speichel und in anderen Sekreten (Murphy, Travers et al. 2012). Überwindet ein Mikroorganismus eine Epithelbarriere und dringt in das Körperinnere ein, so spricht man von einer Infektion. In den meisten Fällen wird diese bereits innerhalb von Minuten oder wenigen Stunden von im Gewebe befindlichen Makrophagen erkannt und die Erreger durch Phagozytose eliminiert. In besonders großer Zahl findet man sie im Bindegewebe, der Submukosa des Verdauungstraktes und etwa als Alveolarmakrophagen in der Lunge. Makrophagen reifen kontinuierlich aus den im Blut zirkulierenden Monozyten heran, um schließlich in peripheres Körpergewebe

einzuwandern. Die neutrophilen Granulozyten stellen die zweite wichtige Hauptfamilie der Phagozyten dar. Sie zirkulieren in großer Anzahl im peripheren Blut und können chemotaktisch vermittelt in das infizierte Gewebe rekrutiert werden. Makrophagen und neutrophile Granulozyten besitzen für die Erkennung von Mikroorganismen spezielle Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, *PRRs*). PRRs lassen sich in 4 Hauptfamilien unterteilen: TLRs (*toll-like receptors*), NLRs (*nucleotide-binding oligomerization domain receptors*), RLRs (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors) und CTLRs (*C-Type lectin-like receptors*). Diese binden bestimmte körperfremde Strukturen über sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Hierbei handelt es sich um im Laufe der Evolution hochkonservierte Muster auf der Oberfläche von Mikroorganismen. Phagozyten verfügen über eine erhebliche Anzahl an PRRs gegen verschiedene Strukturen von Bakterien, Pilzen, Viren sowie Parasiten und ermöglichen die Einleitung einer raschen Immunantwort. Klassische PAMPs, die durch PRRs erkannt werden, sind bakterielle oder mykotische Zellwandbestandteile (z.B. Polysaccharide, Lipopolysaccharide, Peptidoglucone) oder auch virale Nukleinsäuren (Akira, Uematsu et al. 2006). PRRs können nach deren Aktivierung über PAMPs zwei wesentliche zelluläre Reaktionen induzieren. Zum einen die Produktion und Sezernierung von Zytokinen sowie Chemokinen, welche als Mediatoren an der Koordination der Immunreaktion beteiligt sind. Zum andern die Einleitung der Phagozytose des Pathogens. Dies stellt die Internalisierung des gebundenen Fremdkörpers in eine Zellvakuole, auch bekannt als Phagosom, dar. Dort wird dieser durch hydrolytische Enzyme, toxische Metabolite sowie niedrige pH-Bedingungen zersetzt. Ein wichtiger unterstützender Mechanismus hierbei ist die Aktivierung des Enzyms NADPH-Oxidase bzw. dessen Translokation in das Phagosom. Dort katalysiert es die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), etwa von  $H_2O_2$ . ROS stellen zum einen wichtige sekundäre Botenstoffe im Rahmen der Immunantwort dar und sind ebenso maßgeblich an der Zersetzung des Pathogens beteiligt (Brown 2006, Kohchi, Inagawa et al. 2009). Darüber hinaus können bestimmte PRRs auch vom Wirt ausgehende Signale erkennen, um so etwa körpereigene entartete oder beschädigte Zellen zu binden und zu beseitigen. Einige typische Erkennungsstrukturen, sogenannte *damage associated molecular patterns* (DAMPs), sind z. B. Hitzeschock-Proteine, S100-Proteine und Nukleinsäuren (DNA, RNA, mitochondriale DNA). Eine wichtige Ergänzung zu den PRRs ist das Komplementsystem, dessen hauptsächliche Aufgabe ein Mechanismus ist, der als Opsonierung bezeichnet wird. Dies stellt die Bedeckung des Pathogens mit speziellen löslichen Faktoren dar und

vermittelt dadurch dessen Erkennung und Beseitigung durch Phagozyten oder sogar eine direkte Zerstörung des Pathogens.

## 2.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

Rudolf Virchow prägte 1847 erstmals den Begriff der Leukämie, des „weißen Blutes“, womit er auf die starke Vermehrung der Leukozyten im Blut hinwies. Im Allgemeinen sind Leukämien durch die autonome Proliferation eines Zellklons im Knochenmark gekennzeichnet. Häufig führt dies zu einer konsekutiven Verdrängung der normalen Blutbildung (Hämatopoese). Je nach betroffenem Zelltyp werden Leukämien zunächst in eine myeloische oder lymphatische Form unterteilt sowie entsprechend ihrer Verlaufsform als akut oder chronisch bezeichnet. Die Entstehung der AML ist ein dynamischer Prozess und wird durch die Akkumulation von molekulargenetischen Veränderungen sowie oft auch chromosomalen Anomalien innerhalb einer myeloischen Vorläuferzelle ausgelöst, welche die Funktionalität von wichtigen Signalmolekülen beeinträchtigen (Frohling, Scholl et al. 2005). Es kommt dadurch zu einer massiven Vermehrung unreifer Vorstufen von blutbildenden Zellen (Myeloblasten) im Knochenmark, was eine verminderte Bildung von Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten zur Folge hat.

### 2.2.1 Inzidenz und Ätiologie

Das mediane Alter der Patienten beträgt 67 Jahre und die durchschnittliche Inzidenz liegt bei ca. 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen. Mit steigendem Alter nimmt die Häufigkeit der AML zu, sodass bei über 80-jährigen die Inzidenz bei ca. 20 pro 100.000 Personen liegt. Die akute myeloische Leukämie macht etwa 80 % aller akuten Leukämien bei Erwachsenen aus (SEER [*Surveillance, Epidemiology and End Results*] Cancer Statistics Review, 2009-2013, National Cancer Institute 2016). Bekannte Risikofaktoren sind die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und die chronische Belastung mit Chemikalien wie z. B. Benzol. Aber auch Arzneimittel wie Zytostatika, typischerweise Alkylanzien sowie Topoisomerase II-Hemmer, können nach mehrjähriger Latenzzeit eine AML hervorrufen (Rowley and Olney 2002). Auch bei einigen kongenitalen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Down-Syndrom, treten AMLs gehäuft auf. In den meisten Fällen ist die Ursache der Krankheitsentstehung jedoch unklar (Pedersen-Bjergaard, Christiansen et al. 2002).

### **2.2.2 Klinisches Bild und Verlauf**

Die AML ist charakterisiert durch eine zunehmende hämatopoetische Insuffizienz, einem Mangel an funktionsfähigen, ausreifenden Blutzellen sowie einer myeloblastären Infiltration des Knochenmarks. Häufig zeigen sich zunächst nur unspezifische Symptome wie Müdigkeit, reduzierte Leistungsfähigkeit oder Blässe als Ausdruck einer Anämie. Der Mangel an Thrombozyten führt zu einem erhöhten Blutungsrisiko. Die reduzierte Bildung von ausreifenden neutrophilen Granulozyten und die damit einhergehende Schwächung des angeborenen Immunsystems führen vermehrt zu Infektionen, insbesondere in Lunge und Rachenraum. Bei 60 % der Patienten liegt bei Diagnosestellung eine Leukozytose vor. Steigt die Leukozytenzahl auf über 100 Gpt/L besteht die Gefahr einer akut lebensbedrohlichen Leukostase, das Zusammenlagern von Leukozyten in Blutgefäßen. Die Folge sind Gefäßverschlüsse, vor allem in Lunge und Gehirn, was unter anderem zu Hypoxie und neurologischen Ausfällen führt. Bei einem ausschließlichen Einsatz von supportiven Maßnahmen, wie etwa der Gabe von Blutprodukten oder der Behandlung von Infekten, führt eine AML in der Regel innerhalb von wenigen Wochen bis Monaten zum Tod (Deschler and Lubbert 2006).

### **2.2.3 Diagnostik und Klassifikation**

Meist ergibt sich die Verdachtsdiagnose aus den klinischen Symptomen und dem Differentialblutbild. Die Diagnose einer AML erfordert den Nachweis unreifer Vorläuferzellen von mindestens 20 % im Knochenmark und deren Zuordnung zur myeloischen Reihe (WHO-Klassifikation). Durch die Kombination von morphologischen und zytochemischen Befunden des Knochenmarks, in Ergänzung mit einer Immunphänotypisierung sowie zyto- und molekulargenetischer Diagnostik, ist die Diagnose in der Regel zweifelsfrei zu stellen. Die genaue Einteilung des AML-Subtyps richtet sich in erster Linie nach der aktuellen WHO-Klassifikation. Diese ist im Vergleich zur FAB-Klassifikation vorrangig an der molekularen Pathogenese ausgerichtet und bezieht, neben rein zellmorphologischen Charakteristika, vor allem genetische und immunologische Gesichtspunkte mit ein.

### **2.2.4 Therapie**

Primäres Ziel der Therapie ist sowohl die Beseitigung des neoplastischen Zellklons als auch die Wiederherstellung der gesunden Hämatopoese. Die allgemeine Grundlage ist die

Durchführung einer intensiven Chemotherapie, welche in zwei Behandlungsphasen unterteilt werden kann. Zunächst wird mittels einer Induktionstherapie das Erreichen einer kompletten Remission angestrebt. Standardmäßig erfolgt hierfür eine mehrtägige und kombinierte Infusion von Cytarabin (Arabinosylcytosin) mit einem Anthracyclin. Im Anschluss erfolgen unterschiedlich viele Konsolidierungstherapien zur endgültigen Eliminierung residualer Leukämiezellen. Für Patienten mit einem ungünstigen Risikoprofil (ungünstige genetische Aberration, sekundäre AML, insuffizientes Therapieansprechen) sowie der Verfügbarkeit eines Familien- oder Fremdspenders ist die allogene Blutstammzelltransplantation die Therapie der Wahl. Verschiedene Risikofaktoren wie hohes Alter, schlechter Allgemeinzustand und Komorbiditäten indizieren eher weniger belastende, palliative Therapiekonzepte. Hier besteht das vorrangige Ziel in der Beibehaltung einer guten Lebensqualität und der Vermeidung langer Krankenhausaufenthalte. Neben der primären Therapie haben unterstützende Maßnahmen, wie die Transfusion von Blutprodukten und der Einsatz antibiotischer Therapien bei infektiologischen Komplikationen, einen wichtigen Stellenwert. Eine dauerhafte Remission über einen Zeitraum von mehr als 5 Jahren ist mit gegenwärtigen Therapiemaßnahmen momentan nur bei ungefähr 30 % aller Patienten möglich, wobei Patienten unter 60 Jahren eine deutlich günstigere Prognose aufweisen (Buchner, Berdel et al. 2005). Die akute Promyelozytenleukämie (APL) nimmt eine therapeutische und prognostische Sonderstellung ein. Charakteristisch für diesen AML-Subtyp ist das Vorliegen des Fusionsproteins PML-RAR $\alpha$ . Diese Erkrankung kann heute in den meisten Fällen ohne konventionelle Chemotherapie durch Differenzierungsinduktion mit ATRA (all-trans-retinoic acid) und Arsenetrioxid geheilt werden. Durch die spezielle Therapie werden bei der APL Heilungsraten von über 90 % erreicht (Lo-Coco, Avvisati et al. 2013).

## **2.3 Invasive Pilzinfektionen bei Patienten mit AML**

Die Prognose von Patienten mit akuter Leukämie ist neben den biologischen Charakteristika der Erkrankung insbesondere von dem Auftreten therapieassoziierter Komplikationen abhängig. Neben Aspekten der Toxizität einer kurativ intendierten Chemotherapie spielen hierbei in erster Linie infektiologische Komplikationen eine entscheidende prognostische Rolle. Invasive Pilzinfektionen (IPI) treten bei Patienten mit AML häufig auf und sind eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität (Auberger, Lass-Flörl et al. 2008). Die Inzidenz ist in Studien mit bis zu 20 % angegeben und ist verglichen mit anderen akuten

Leukämien oder myelodysplastischen Syndromen (MDS) mit der höchsten Inzidenz behaftet (Michallet and Ito 2009, Pagano, Caira et al. 2010). Darüber hinaus kommt es durch das Auftreten von invasiven Pilzinfektionen regelmäßig zu einer Verzögerung der primären Therapie oder wichtiger Folgetherapien für die Behandlung der AML und hat somit eine Verschlechterung der Gesamtprognose zur Folge. Aus ökonomischer Sicht führen die damit verbundenen längeren Krankenhausaufenthalte zu einer bedeutenden Steigerung der Therapiekosten (Menzin, Lang et al. 2005).

### **2.3.1 Erreger und Krankheitsbilder**

Pilzinfektionen bei hämatologischen Patienten umfassen in erster Linie Infektionen durch Schimmelpilze, insbesondere durch *Aspergillus spp.*, wobei der klinisch bedeutendste Vertreter dieser Gruppe *Aspergillus fumigatus* ist. Es können aber auch Infektionen durch Hefepilze auftreten, welche in der Regel durch *Candida spp.* hervorgerufen werden (Pagano, Caira et al. 2006).

Eine invasive Aspergillose (IA) manifestiert sich bei neutropenen hämatologischen Patienten meist in der Lunge (pulmonale Aspergillose). Aber auch der Befall der Nasennebenhöhlen bis hin zum Durchbruch in das zentrale Nervensystem (ZNS) ist möglich. Hier können auch Pilze aus der Reihe der Zygomyceten (Mukormykose) eine Rolle spielen. Infektionen durch *Candida spp.* treten meist systemisch in Form eines Befalls des Blutstroms auf (Betts, Glasmacher et al. 2006).

### **2.3.2 Exogene Risikofaktoren**

Invasive Pilzinfektionen werden zumeist von opportunistischen Pilzen hervorgerufen. Diese sind in der Umwelt prävalent und können einen immunkompetenten Menschen in der Regel allenfalls besiedeln. Eine Grundvoraussetzung für eine Infektion ist somit das Vorhandensein einer wesentlichen Abwehrschwäche des Wirts. Infolge der Induktionschemotherapie bei Patienten mit AML kommt es zu einer ausgeprägten Immunsuppression, hervorgerufen durch das Fehlen von Abwehrzellen, vor allem von neutrophilen Granulozyten (Neutropenie). Diese dauert, je nach Chemotherapieregime, bis zu vier Wochen, in Einzelfällen auch deutlich länger und stellt den wesentliche Risikofaktor für invasive Pilzinfektionen dar (Schaich, Rolig et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz invasiver Mykosen sowohl mit der Dauer als auch mit dem Grad der Neutropenie ansteigt (Bodey 1966). Weitere begünstigende Faktoren sind der Einsatz von

antibakteriellen Breitspektrumantibiotika, das Vorliegen einer Bakteriämie, eine Niereninsuffizienz, der längere Aufenthalt auf einer Intensivstation, parenterale Ernährung oder eine vorhergehende gastrointestinale Operation (Bhatt, Viola et al. 2011). Eine besonders hohe Inzidenz und Mortalitätsrate weisen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation auf (Lin, Schranz et al. 2001, Wiederhold, Lewis et al. 2003).

### 2.3.3 Genetische Risikofaktoren

Inwieweit genetische Merkmale des Wirts die Anfälligkeit für invasive Pilzinfektionen beeinflussen, ist Gegenstand aktueller Forschungen. Neben einigen seltenen monogen bedingten Defekten, wie der septischen Granulomatose oder Leukozyten-Adhäsionsdefekten, spielen bei hämatologischen Patienten vermutlich in erster Linie SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) eine Rolle. Sie stellen vererbare genetische Varianten einzelner Nukleotide in der DNA-Sequenz dar und sind mit einer gewissen Häufigkeit (Allelfrequenz) in einer Population verteilt. Solche individuellen Variationen treten in ca. 0,1 % des menschlichen Genoms auf und betrifft damit ca. 3 Millionen Basenpaare. Diese haben oftmals nur einen marginalen Effekt auf biologische Funktionen des Organismus. Unter gewissen Umständen, wie etwa einer vorhandenen Abwehrschwäche, können jedoch auch diese zu unterschiedlichen Qualitäten der Immunabwehr führen. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche humane SNPs hinsichtlich ihrer Assoziation mit der Infektionsanfälligkeit, insbesondere durch *Candida* und *Aspergillus ssp.*, studiert (Pana, Farmaki et al. 2014). Gut charakterisierte SNPs, welche bei hämatologischen Patienten in Zusammenhang mit IPIs gebracht werden konnten, sind beispielsweise auf Genen von MBL-2 (Mannose-bindendes Lektin 2), Interleukinen (vor allem IL-10), verschiedenen TLRs oder CTLRs wie Dectin-1 oder DC-SIGN lokalisiert (Pana, Farmaki et al. 2014).

## 2.4 Dectin-1

Dectin-1 (*Dendritic cell-associated C-type lectin 1*) ist ein Mustererkennungsrezeptor der angeborenen Immunität und wird hauptsächlich in Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie bestimmten T-Zellen exprimiert (Brown 2006). Gewebsspezifisch ist Dectin-1 vor allem in Lunge und Intestinum sowie in Regionen mit hohen T-Zell-Konzentrationen wie Milz, Thymus und Lymphknoten vorhanden (Reid, Montoya et al. 2004). Er ist der hauptsächliche Immunrezeptor für die Erkennung von  $\beta$ -Glucan, ein häufig vorkommendes Polysaccharid in der Pilzzellwand.

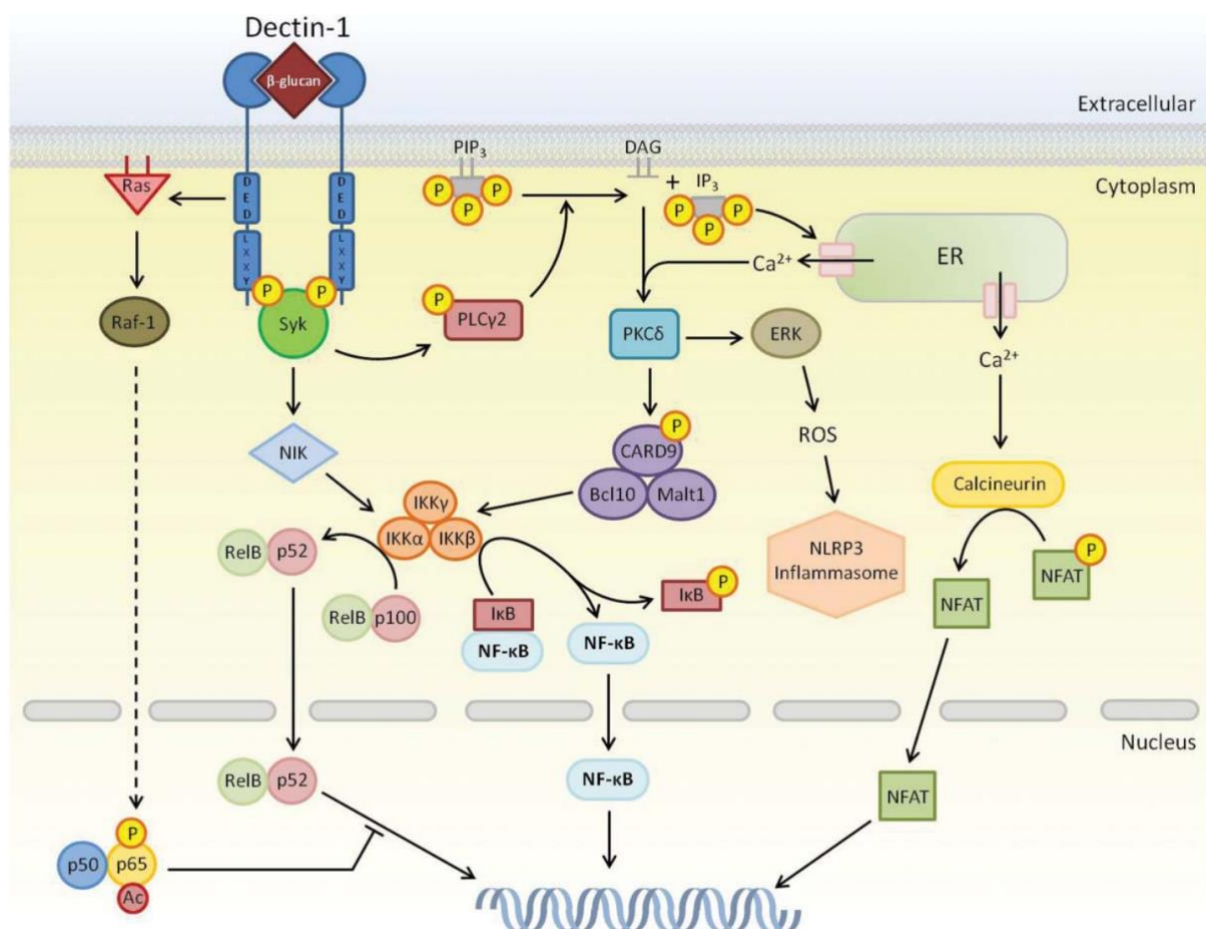
Das entsprechende Gen, CLEC7A, ist auf dem Chromosom 12p13 lokalisiert. Es beinhaltet 6 Exons und dessen mRNA codiert, je nach Spleißvariante, ein bis zu 247 Aminosäure (28 kDa) großes Typ-II-Transmembranprotein. Dectin-1 ist ein sogenanntes nicht-klassisches Lektin vom C-Typ. Der Rezeptor verfügt über eine extrazelluläre CRD (*carbohydrate recognition domain*), welche für die Erkennung von  $\beta$ -Glucanen in Pilzzellwänden essentiell ist. Es folgen eine Halsregion (*stalk region*) sowie eine Transmembran- und schließlich eine zytoplasmatische hemITAM-Domäne (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Das Vermögen  $\beta$ -Glucanmuster über die CRD zu binden, befähigt Dectin-1 zur Erkennung verschiedener Pilzspezies wie etwa *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidioides*, *Penicillium*, *Pneumocystis* und *Saccharomyces* (Plato, Willment et al. 2013). Mittlerweile sind auch  $\beta$ -Glucan-unabhängige Interaktionen von Dectin-1 gezeigt worden, wie etwa die Erkennung von Mykobakterien sowie einem endogenen Liganden auf T-Zellen (Ariizumi, Shen et al. 2000, Yadav and Schorey 2006). Die Bindung von  $\beta$ -Glucan durch Dectin-1 induziert eine Reihe von zellulären Reaktionen wie die Aktin-vermittelte Phagozytose, Generierung von ROS, Reifung von dendritischen Zellen und die Produktion und Freisetzung von Zytokinen sowie Chemokinen wie etwa TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL2, CCL3 und GM-CSF (Schorey and Lawrence 2008). Hinsichtlich der Stimulation von Dectin-1 mit  $\beta$ -Glucan ist hervorzuheben, dass nicht das lösliche  $\beta$ -Glucan sondern eine partikuläre Form erforderlich ist, um die nachgeschaltete Signaltransduktion effektiv zu induzieren (Goodridge, Reyes et al. 2011).

### 2.4.1 Signaltransduktion

Wichtigstes Element für die Induktion einer zellulären Immunantwort infolge der Dectin-1-Aktivierung stellt die zytoplasmatisch lokalisierte hemITAM-Domäne dar. Diese ist in der Lage Syk (*spleen tyrosine kinase*) zu aktivieren, welche wiederum zur kanonischen Aktivierung von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) führt (Abbildung 1). Syk phosphoryliert hierbei zunächst PLC $\gamma$ 2 (*Phospholipase-C, Isoform  $\gamma$ 2*). Dies katalysiert die Bildung von löslichem IP $_3$  aus membrangebundenem PIP $_2$  (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat*) und DAG (*Diacylglycerol*). Lösliches IP $_3$  führt zu einem Ca $^{2+}$ -Influx aus dem ER (endoplasmatisches Retikulum) in das Zytoplasma. Dies aktiviert Calcineurin und bewirkt darüber die Aktivierung von NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), ein



Transkriptionsfaktor, welcher im Wesentlichen die Produktion von IL-2 und IL-10 steuert und damit die Differenzierung von T-Zellen regulieren kann (Fric, Zelante et al. 2012). Die Bildung von DAG führt zur Aktivierung von PKC $\delta$  (*Proteinkinase C, Isoform  $\delta$* ). PKC $\delta$  phosphoryliert CARD9 (*Caspase recruitment domain-containing protein 9*). In der Folge kommt es zur Bildung eines Komplexes aus CARD9, Bcl10 (*B-cell lymphoma 10*) und Malt1 (*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*), welcher zu einer kanonischen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt (Gross, Gewies et al. 2006). Im Detail kommt es zu einer IKK-vermittelten Ablösung von phosphoryliertem I $\kappa$ B $\alpha$  (*nuclear factor of  $\kappa$  light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*) von den NF- $\kappa$ B-Komplexen p65/p50 oder c-Rel/p50. Die Entkopplung der Komplexe von I $\kappa$ B $\alpha$  führt schließlich zu deren Translokation in den Zellkern. Dort können diese als Transkriptionsfaktoren wirken und die Expression verschiedener Zytokine induzieren (Gringhuis, den Dunnen et al. 2009).



**Abbildung 1: Intrazelluläre Signaltransduktion von Dectin-1 (Modell nach Plato 2013)**

Dectin-1 vermittelt sowohl eine Syk-abhängige als auch Syk-unabhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Zentral hierfür ist die nukleäre Translokation und damit Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Dimeren zur Regulation der Genexpression verschiedener proinflammatorischer Komponenten. Der Dectin-1-Syk-Komplex aktiviert PLC $\gamma$ 2, welches die Bildung der second messenger IP $_3$  sowie DAG an der Zytoplasmamembran katalysiert. Lösliches IP $_3$  vermittelt einen Ca $^{2+}$ -Influx aus dem ER, was zur Aktivierung von Calcineurin und damit des Transkriptionsfaktors NFAT führt. DAG aktiviert PKC $\delta$  und führt zu einer Komplexbildung von CARD9, Bcl10 und Malt1 mit nachfolgender

kanonischer Aktivierung von NF- $\kappa$ B (RelA/p50). Alternativ kann die Dectin-1/Syk-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B (RelB/p52) über NIK auf einen nicht-kanonischen Weg erfolgen. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird ebenso Syk-unabhängig über Raf-1 beeinflusst. Aktiviertes Raf-1 führt zu einer Acetylierung sowie Phosphorylierung von RelA/p50 und hierdurch zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität der RelA/p50-Dimere. Gleichzeitig wird durch diese Modifikation die Aktivität von RelB/p52-Dimeren inhibiert. PKC $\delta$  kann ebenso den inflammatorischen Proteinkomplex NLRP3 aktivieren, der eine wichtige Schnittstelle zur Freisetzung von IL-1 $\beta$  darstellt (Plato, Willment et al. 2013).

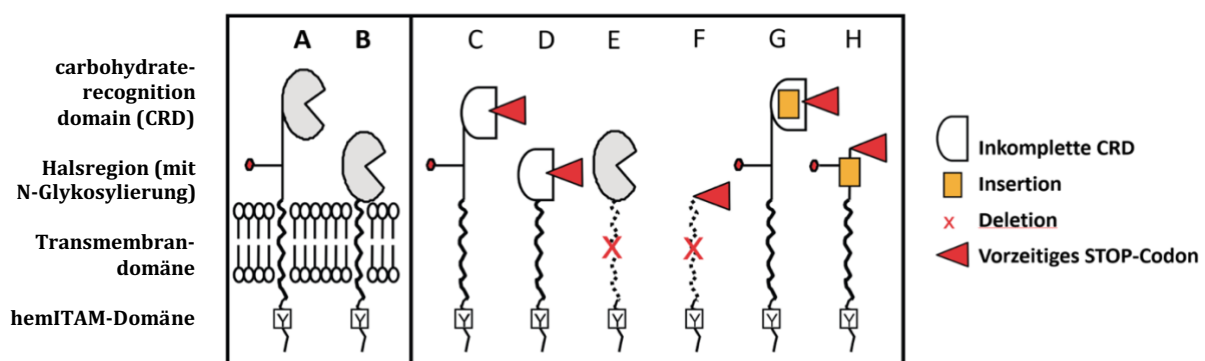
Syk ist ebenso befähigt den nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg über NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) zu aktivieren. Dabei aktiviert NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) IKK $\alpha$  (*I $\kappa$ B kinase  $\alpha$* ) und es kommt zu einer proteasomalen Prozessierung des NF- $\kappa$ B-Dimers RelB/p100 zu RelB/p52 und schließlich zu dessen Translokation in den Zellkern. Weiterhin kann Dectin-1 NF- $\kappa$ B über einen Syk-unabhängigen Signalweg modifizieren. Dies erfolgt durch die Dectin-1-vermittelte Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase Raf-1 (*rapidly accelerated fibrosarcoma 1*). Raf-1 bewirkt die Phosphorylierung der p65-Untereinheit an Ser276 und seine darauffolgende Acetylierung. Es kommt hierdurch zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität von p65. Gleichzeitig ist phosphoryliertes p65 in der Lage auf nicht-kanonischem Weg aktiviertes RelB zu binden und damit dessen transkriptionelle Aktivität zu inhibieren. Die Raf-1-spezifische Modulation von NF- $\kappa$ B-Dimeren begünstigt die Aktivierung von T-Zellen über die Produktion von IL-12 und damit eine T<sub>H</sub>1-Zelldifferenzierung, aber auch eine T<sub>H</sub>17-Polarisierung über die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-23 (Gringhuis, den Dunnen et al. 2009).

Neben seinem Vermögen der komplexen Regulation von NF- $\kappa$ B-Signalrouten, ist Dectin-1 ein sehr effektiver Rezeptor für die Vermittlung der Phagozytose von  $\beta$ -Glucanpartikeln sowie lebenden Pilzen. Im Gegensatz zu den meisten TLRs kann Dectin-1 diese unabhängig von anderen Kofaktoren initiieren. Die Induktion erfolgt abhängig von einer Tyrosin-Phosphorylierung der hemITAM-Domäne sowie bestimmter Src-Kinasen. Ferner scheint die Phagozytose in dendritischen Zellen Syk-abhängig zu sein, in Makrophagen jedoch Syk-unabhängig (Goodridge, Shimada et al. 2009). In engem Zusammenhang mit der Phagozytose des Erregers steht die Produktion von ROS innerhalb des Phagosoms. Dieser Prozess ist, neben einem lysosomatisch-vermittelten Abbau, maßgeblich an der Zersetzung des Pathogens beteiligt. Durch Experimente mit opsoniertem Zymosan konnte ebenso gezeigt werden, dass Dectin-1 in direkter Weise an der Generierung von ROS beteiligt ist (Saijo, Fujikado et al. 2007, Taylor, Tsoni et al. 2007). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass sowohl die Aktivierung der hemITAM-Domäne als auch Src und Syk in der Dectin-1-vermittelten Produktion von

ROS involviert sind (Underhill, Rossmagale et al. 2005).

## 2.4.2 Proteinisoformen

Insgesamt sind 8 Proteinisoformen von Dectin-1 bekannt, wobei die hauptsächlich exprimierten Varianten Isoformen A und B sind (Willment, Gordon et al. 2001). Nur diese sind in der Zellmembran lokalisiert und haben gleichzeitig eine funktionelle CRD für die Bindung von  $\beta$ -Glucanen (Abbildung 2). Die Isoformen A und B unterscheiden sich durch die 46 Aminosäuren lange Halsregion zwischen CRD und Transmembrandomäne, welche nur bei Isoform A vorhanden ist. Diese erweiterte extrazelluläre Domäne von Isoform A ist mit einer zusätzlichen N-Glykosylierung an Asparagin 91 verbunden. Es konnte an Dectin-1-Zellmodellen von HEK293 gezeigt werden, dass die Glykosylierung nicht essentiell für das  $\beta$ -Glucan-Bindungsvermögen ist, jedoch die Expression auf der Plasmamembran positiv beeinflusst und mit einer stärkeren Aktivierung von NF- $\kappa$ B assoziiert ist (Kato, Adachi et al. 2006). Weiterhin zeigen Untersuchungen, dass Variante B bei niedrigen Temperaturen eine schwächere Affinität zu Zymosan aufweist (Heinsbroek, Taylor et al. 2006). Über die übrigen Isoformen (C - H) ist bislang wenig bekannt und es wird davon ausgegangen, dass sie zellbiologisch keine signifikante Relevanz haben. Eine Ausnahme könnte Isoform E bilden. Diese weist eine vollständige CRD sowie hemITAM Domäne auf, jedoch keine Transmembran- sowie Halsregion. Xie und Kollegen beschrieben zum einen die zytoplasmatische Retention von Isoform E anhand von transfizierten HEK293-Zellen sowie eine Bindung mit RanBP9 (*Ran-binding protein 9*). Eine funktionelle Bedeutung dieser Interaktion wurde in der Studie nicht weiter beschrieben (Xie, Sun et al. 2006).



**Abbildung 2: Übersicht der humanen Dectin-1-Isoformen**

Der humane Rezeptor Dectin-1 wird in Form von zwei Isoformen exprimiert (A und B). Nur diese verfügen über eine vollständige CRD zur Erkennung und Bindung von  $\beta$ -Glucanstrukturen. Die weiteren Isoformen (C - H) haben keine funktionelle CRD oder sind nicht-membranständige Varianten.

### 2.4.3 Klinische Bedeutung von Dectin-1-SNPs

Es wurden bereits verschiedene Dectin-1-SNPs hinsichtlich ihrer Assoziation mit invasiven Pilzinfektionen untersucht. An dieser Stelle soll insbesondere eine Übersicht von bedeutenden SNPs im Zusammenhang mit der Infektionsanfälligkeit bei immunsupprimierten hämatologischen Patienten gegeben werden. Einer der am besten charakterisierten Dectin-1-SNPs ist Y238X (rs16910526), welcher zum Einbau eines vorzeitigen Stop-Codons führt und damit zu einer Deletion der zehn C-terminal gelegenen Aminosäuren der CRD. In der kaukasischen Bevölkerung kommt dieser Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von ca. 7 % vor und resultiert in einer reduzierten Membranexpression von Dectin-1 sowie einer abgeschwächten Zytokinproduktion infolge der Stimulation mit  $\beta$ -Glucan (Ferwerda, Ferwerda et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Y238X bei knochenmarktransplantierten hämatologischen Patienten mit einer erhöhten Kolonisierung von *Candida ssp.* sowie mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen mit *Aspergillus ssp.* assoziiert ist (Plantinga, van der Velden et al. 2009, Cunha, Di Ianni et al. 2010). Andere Studien konnten keinen Einfluss von Y238X auf das Auftreten von bestimmten Infektionen beobachten. So konnte Chai und Kollegen keinen Zusammenhang mit der Häufigkeit von invasiven Aspergillosen (IA) bei stammzelltransplantierten Patienten feststellen (Chai, de Boer et al. 2011). In einer anderen Studie an insgesamt 182 immunsupprimierten hämatologischen Patienten ergab sich ebenfalls keine Korrelation mit dem Auftreten von IA und dem Vorliegen von Y238X (Sainz, Lupianez et al. 2012). Auch bezüglich der Häufigkeit von Infektionen durch *Candida ssp.* konnte in einer Untersuchung an insgesamt 238 Candidämie- gegenüber 262 Kontrollpatienten kein Zusammenhang festgestellt werden (Rosentul, Plantinga et al. 2011). Neben dem exonisch gelegenen Y238X-Polymorphismus finden sich auch Untersuchungen zu intronisch lokalisierten SNPs von Dectin-1. Eine umfangreichere Analyse hinsichtlich eines klinischen Zusammenhangs verschiedener Intron-SNPs erfolgte in der beschriebenen Studie von Sainz und Kollegen. Hierbei konnten für die SNPs rs3901533 sowie rs7309123 eine Assoziation mit IA gezeigt werden. Insbesondere für rs7309123 ergab sich eine besonders hohe Signifikanz. Die Autoren vermuten hier einen funktionellen Zusammenhang des Genotyps mit der mRNA-Stabilität von Dectin-1. Eine klinische Assoziation von rs7309123 mit IA konnte ebenfalls im Kontext der chronischen pulmonalen Aspergillose gezeigt werden (Smith, Hankinson et al. 2014).

#### **2.4.4 Toll-like-Rezeptor 2 und Dectin-1**

Der Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) stellt einen weiteren in der Plasmamembran lokalisierten PRR zur Erkennung konservierter pathogener Strukturen dar. Wie auch Dectin-1, wird er auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Der Rezeptor weist von allen PRR der TLR-Rezeptorfamilie das vielfältigste Spektrum an pathogen assoziierten Agonisten auf. Diese umfassen etwa bakterielle Lipopeptide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäure aus grampositiven Bakterien, Lipoarabinomannan aus Mykobakterien, Zymosan aus Pilzen und weitere (Kawai and Akira 2010). Beschrieben wird auch eine möglichen Heterodimerisierung mit TLR1 oder TLR6 und der davon abhängigen Affinität von TLR2 zu unterschiedlichen Lipopeptiden (Takeuchi, Kawai et al. 2001, Takeuchi, Sato et al. 2002). Polymorphismen von TLR2 sind in intensiv therapierten AML-Patienten ebenso mit infektiösen Komplikationen wie Sepsis oder Pneumonien behaftet (Schnetzke, Spies-Weisshart et al. 2015). Verschiedene Arbeiten beschreiben ein enges Zusammenwirken zwischen TLR2 und Dectin-1 bezüglich der Erkennung und Beseitigung von mykotischen Pathogenen sowie der gegenseitigen Verstärkung der Immunantwort. Im Detail konnte eine synergistische Kollaboration der beiden Rezeptoren hinsichtlich der transkriptionellen NF- $\kappa$ B-Aktivität sowie der Sekretion verschiedener inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-12 oder TNF- $\alpha$  dargestellt werden (Gantner, Simmons et al. 2003, Ferwerda, Meyer-Wentrup et al. 2008, Goodridge and Underhill 2008).

### 3 Zielstellungen der Arbeit

Ziel des ersten klinischen Teils dieser Arbeit war es, eine mögliche Assoziation verschiedener Polymorphismen der Immunrezeptoren Dectin-1 und TLR2 hinsichtlich des Auftretens pulmonaler Pilzinfektionen bei Patienten mit AML nach erfolgreicher Induktionschemotherapie zu prüfen. Die Erkenntnisse sollen zu einer besseren Risikostratifizierung bezüglich des Auftretens von invasiven Pilzinfektionen bei hämatologischen Patienten beitragen. Hierfür wurden in einer retrospektiv angelegten Studie 186 Patienten mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie bezüglich der SNPs Dectin-1 rs16910526, rs7309123 sowie TLR2 rs5743708 genotypisiert und der entsprechende Genotyp mit klinischen Befunden in Korrelation gesetzt. Alle Patienten sind am Universitätsklinikum Jena im Zeitraum von 2000 bis 2014 behandelt worden und haben eine intensive Induktionschemotherapie erhalten. Der Beobachtungszeitraum beinhaltet den Beginn der Chemotherapie bis zur Entlassung aus dem Krankenhaus. Das Auftreten von Pilzpneumonien wurde entsprechend der EORTC- / MSG-Diagnosekriterien bewertet.

Im zweiten Teil erfolgte eine zellbiologische Charakterisierung der beiden Dectin-1-Isoformen A und B. Die Erkenntnisse sollen zu einem erweiterten Verständnis hinsichtlich unterschiedlicher funktioneller Eigenschaften der beiden Isoformen beitragen, welche in der Literatur nur unvollständig beschrieben sind. Zunächst erfolgte die Analyse von primären humanen Monozyten hinsichtlich einer differenziellen Expression der beiden Dectin-1-Isoformen im Verlauf ihrer Zelldifferenzierung zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Weiterhin wurden Isoform-spezifische humane Zellkulturmodelle auf Basis der monozytären Zelllinie THP-1 sowie der embryonalen Nierenzelllinie HEK293 generiert. Die gentechnischen Arbeiten hierfür erfolgten in Kooperation mit PD Dr. Jörg Müller im CMB (Center for Molecular Biomedicine, Jena). Es wurde eine vergleichende Analyse der beiden Isoform-Varianten hinsichtlich deren Oberflächenexpression und dessen Abhängigkeit von der Rezeptorglykosylierung durchgeführt. Des Weiteren erfolgten die Bestimmung der  $\beta$ -Glucan-Bindungskapazität, der Vergleich der intrazellulären Signaltransduktion sowie das Vermögen zur extrazellulären Zytokinfreisetzung.

## **4 Publizierte Originalarbeiten**

### **4.1 Publikation I**

Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 Predispose to Invasive Fungal Disease in Patients with Acute Myeloid Leukemia. Fischer, M., B. Spies-Weisshart, K. Schrenk, B. Gruhn, S. Wittig, A. Glaser, A. Hochhaus, S. Scholl and U. Schnetzke. PLoS One 11(3): e0150632. DOI: 10.1371/journal.pone.0150632 (2016).



RESEARCH ARTICLE

# Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 Predispose to Invasive Fungal Disease in Patients with Acute Myeloid Leukemia

Mike Fischer<sup>1</sup>, Baerbel Spies-Weisschart<sup>1</sup>, Karin Schrenk<sup>1</sup>, Bernd Gruhn<sup>2</sup>, Susan Wittig<sup>2</sup>, Anita Glaser<sup>3</sup>, Andreas Hochhaus<sup>1</sup>, Sebastian Scholl<sup>1</sup>✉, Ulf Schnetzke<sup>1</sup>✉\*

**1** Klinik für Innere Medizin II, Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany, **2** Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany, **3** Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [ulf.schnetzke@med.uni-jena.de](mailto:ulf.schnetzke@med.uni-jena.de)



## Abstract

### Background

Patients with acute myeloid leukemia (AML) who undergo induction chemotherapy are at high risk for invasive fungal disease (IFD). Dectin-1, a C-type lectin family member represents one of the most important pattern recognition receptors of the innate immune system and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Dectin-1 gene have been associated with an increased risk of infectious complications. We sought to investigate the impact of three different Dectin-1 SNPs and one TLR2 SNP on developing IFD in 186 adult patients with newly diagnosed AML following anthracycline-based induction chemotherapy.

### Patients and methods

Genotyping of Dectin-1 SNPs (rs16910526, rs3901533 and rs7309123) and TLR2 SNP (rs5743708) was performed by TaqMan method and pyrosequencing. IFD was defined according to the EORTC/MSG consensus guidelines. Multiple logistic regression analyses were applied to evaluate the association between the polymorphisms and the occurrence of pulmonary infections. Dectin-1 expression studies with SNP genotyped human monocytes were performed to elucidate susceptibility to IFD following chemotherapy.

### Results

We could demonstrate that patients carrying the Dectin-1 SNP rs7309123 G/G (n = 47) or G/G and C/G (n = 133) genotype revealed a significant higher risk for developing both pneumonia in general (adjusted odds ratio (OR): 2.5; p = 0.014 and OR: 3.0, p = 0.004) and pulmonary IFD (OR: 2.6; p = 0.012 and OR: 2.4, p = 0.041, respectively). Patients carrying the TLR2 SNP rs5743708 (R753Q, GA/AA genotype, n = 12) also revealed a significantly higher susceptibility to pneumonia including IFD. Furthermore, Dectin-1 mRNA expression in human monocytes was lower following chemotherapy.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Fischer M, Spies-Weisschart B, Schrenk K, Gruhn B, Wittig S, Glaser A, et al. (2016) Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 Predispose to Invasive Fungal Disease in Patients with Acute Myeloid Leukemia. PLoS ONE 11(3): e0150632. doi:10.1371/journal.pone.0150632

**Editor:** Ken Mills, Queen's University Belfast, UNITED KINGDOM

**Received:** December 20, 2015

**Accepted:** February 17, 2016

**Published:** March 10, 2016

**Copyright:** © 2016 Fischer et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the 'Förderprogramm Infektiologie 2013' as a grant from Gilead (Munich, Germany).

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.



## Conclusion

To our best knowledge, this study represents the first analysis demonstrating that harbouring polymorphisms of Dectin-1 (rs7309123) or TLR2 (rs5743708) represents an independent risk factor of developing IFD in patients with AML undergoing induction chemotherapy.

## Introduction

Patients with acute myeloid leukemia (AML) who undergo curative intent induction chemotherapy are at high risk for infectious complications. Despite advances in prophylaxis against bacterial and fungal pathogens infections remain a major cause of morbidity and mortality during long lasting neutropenia in this group of patients [1, 2].

Invasive aspergillosis (IA) is the most common invasive fungal infection during induction chemotherapy and remains a life-threatening condition. Real-life data of invasive fungal disease (IFD) according to EORTC/MSG criteria in AML patients treated with induction chemotherapy describe an incidence of up to 27% when possible IFD is considered as well [3–5].

After the recognition of fungal conidia the innate immune system acts by multiple interactions of many receptors at several sites. Neutrophils and monocytes are activated by pattern recognition receptors (PRRs) recognizing fungal pathogens. Dectin-1 (Dendritic cell-associated C-type lectin-1), a C-type lectin family member represents one of the most important and most studied PRRs in the innate immune response against *Aspergillus spp.* Dectin-1 is highly expressed on neutrophils, monocytes and dendritic cells (DCs) [6]. Recently, Dectin-1 expression was also found on pulmonary epithelial cells, emphasizing the importance of Dectin-1 and its potential role in the pathogenesis of pulmonary IFD [7]. Dectin-1 recognizes fungal  $\beta$ -glucans, induces phagocytosis and the production of various soluble mediators for clearance of the fungal pathogen. In addition, the adaptive immune system is also directly modulated by Dectin-1 in a Th1 and Th17 dependent manner [8].

Unlike other non-Toll-like receptors (TLRs) PRRs Dectin-1 is characterised by the presence of a functional, tyrosine-based activation like motif (ITAM) at its cytoplasmic tail. Downstream signalling of Dectin-1 is partially mediated through the tyrosine kinase Syk which directly interacts with the phosphorylated receptor via its SH2 domains [9].

Polymorphisms in human PRRs have been associated with an increased risk of infectious complications including IA in susceptible hosts [10]. A functional single nucleotide polymorphism (SNP) in the Dectin-1 gene (Y238X—rs16910526) generates an early stop codon leading to the loss of the last C-terminal 10 amino acids of the carbohydrate-recognition domain resulting in a diminished surface expression of the Dectin-1 receptor on immune cells [11]. Two other polymorphisms in Dectin-1 introns (rs3901533, rs7309123) were also associated with the development of IA in patients with hematologic diseases although the functional consequences have not been studied yet [12].

Recently, we could demonstrate that functionally relevant TLR2 (Arg753Gln—rs5743708) and TLR4 (Asp299Gly—rs4986790, Thr399Ile—rs4986791) polymorphisms significantly contribute to infectious complications like sepsis and pneumonia in AML patients undergoing induction chemotherapy [3]. There are numerous reports in the literature that describe a synergism between Dectin-1 and TLR2 receptors with regard to the release of cytokines and cross-talk signalling in response to fungal pathogens [13]. Although TLR2 has been intensively studied for its significance on bacterial lipoprotein signalling it has also been shown that the receptor plays a role in host defense against fungal infections both alone and synergistic with Dectin-1 [14].

**Table 1. Patients and clinical characteristics.**

	n = 186	P values *
Median age, years (range)	58 (19–78)	n.s.
Male sex, no (%)	83 (44.6)	n.s.
Cytogenetic risk group		n.s.
good (%)	20 (10.7)	
intermediate (%)	108 (58.1)	
poor (%)	58 (31.2)	
WBC count at diagnosis (/nl), median (range)	14.2 (0.3–330)	n.s.
Platelet count at diagnosis (/nl), median (range)	45 (2–332)	n.s.
Hemoglobin level at diagnosis (mmol/l), median (range)	5.7 (2.5–8.8)	n.s.
Peripheral blood blasts (%), median (range)	27 (0–99)	n.s.
Bone marrow blasts (%), median (range)	75 (17–99)	n.s.
Outcome after induction chemotherapy		
Alive	183	
Dead	3	

\* P-values (calculated for IFD).

Abbreviation

WBC, white blood cell.

doi:10.1371/journal.pone.0150632.t001

In this study we hypothesized an impact of three different Dectin-1 SNPs and one functionally relevant TLR2 SNP on the susceptibility to IFD in 186 adult AML patients who received and anthracycline-based induction chemotherapy.

## Patients and Methods

### Patients

A group of 186 Caucasian patients (83 male, 103 female; median age 58 years, range 19–78 years) with newly diagnosed AML (excluding acute promyelocytic leukemia) were included in this retrospective single institution study covering diagnoses between 2000 and 2014. Informed written consent for all determinations and genetic analyses was obtained from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki. The local ethics committee (Ethikkommission, Universitätsklinikum Jena, Germany) provided institutional review board approval for this study.

Treatment protocols for induction chemotherapy were applied according to the Ost-deutsche Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie (OSHO): AML96 or AML2002 protocols containing idarubicine for patients up to 60 years old and AML97 or AML2004 protocols containing mitoxantrone for elderly patients [15, 16].

All patients received either trimethoprim–sulfamethoxazole or ciprofloxacin and fluconazole or posaconazole for antibiotic and antifungal prophylaxis, respectively.

Clinical data are presented in Table 1. The observational period was defined by the interval between start of induction chemotherapy and the discharge from hospital after hematologic reconstitution.

Following induction chemotherapy three patients died of infectious complications including two within the first 30 days. The third patient did not show hematologic recovery and died at day 84 from the start of induction chemotherapy without evidence of relapse.

## Cytogenetic analyses

Bone marrow or peripheral blood cells were karyotyped according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [17]. Determination of cytogenetic risk groups was performed according to established recommendations [18]. Due to poor quality material cytogenetic analysis could not be performed in six patients.

## Diagnostic criteria of pneumonia

Pneumonia was defined as a new infiltrate on chest radiograph (X-ray and/ or computer tomography) in combination with at least two of the following criteria: cough, sputum production, temperature  $>38^{\circ}\text{C}$  or  $<35^{\circ}\text{C}$ , hemoptysis, thoracic pain or auscultatory findings consistent with pneumonia. Pneumonia was classified as atypical by radiographic criteria and pulmonary IFD was diagnosed based upon the criteria reported by the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) in 2008 [19].

## Analysis of TLR and Dectin-1 polymorphisms

Genotyping of the TLR2 R753Q rs5743708 and Dectin-1 Y238X rs16910526 was performed by pyrosequencing. The genotype of Dectin-1 rs7309123 and rs3901533 was determined by TaqMan assay. Genomic DNA was extracted from peripheral blood or bone marrow samples using the QIAamp Blood Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). PCR and sequencing primers were designed using the PSQ assay design tool: TLR2 rs5743708 forward primer: 3'-Biotin- GGTGCAAGTATGAACTGGACTTCT-5', reverse primer 3'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-5'; Dectin-1 rs16910526 forward primer: 3'- TGA CTGACACGTGAATCCATACA-5', reverse primer: 3'- Biotin- TCAATGTAAGAGGAAGG GTGGAG -5'. 100 ng genomic DNA was amplified using the following cycling conditions for the TLR2 rs5743708:  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes, 35 cycles of  $92^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds,  $63^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds and  $72^{\circ}\text{C}$  for 30s followed by a final extension of  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. For the Dectin-1 rs16910526 PCR annealing temperature was  $62^{\circ}\text{C}$ .

For all PCRs primer concentrations were 600 nM each at a final volume of 25  $\mu\text{l}$  with 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Pyrosequencing was performed using PyroMark Gold Q96 Reagents with the sequence analysis mode of the PyroMark Q96 ID system according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany).

Sequencing primers (TLR2 rs5743708: 3'- TCTTGGTGTTCATTATCTTC- '5; Dectin-1 rs16910526: 3'-GAGGGCACACTACACA- '5) were used at 400 nM final concentration.

Allele detection of Dectin-1 rs7309123 und rs3901533 were examined with the use of a commercially available TaqMan SNP genotyping assay kit and PCR System 9700HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in accordance with the manufacturers instructions. TaqMan Genotyper Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) was used for genotyping analysis.

Negative and positive controls were included in pyrosequencing and TaqMan assays as a quality control measure.

## Isolation of human monocytes

Peripheral blood samples were collected from AML patients and mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque. PBMCs were washed 2x in PBS and subsequently isolated with CD14 Microbeads according to the manufacturer's

instruction (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). Monocyte purity was greater than 97% as assessed by flow cytometry (data not shown).

## RNA preparation and qRT-PCR analyses

Total RNA were isolated using innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena, Jena, Germany) according to standard protocol. First-strand cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA using M-MLV reverse transcriptase according to standard protocol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Analyses were performed using the Mastercycler® ep realplex Real-time PCR System (Eppendorf, Hamburg, Germany). The reaction set up (20 µl) was as follows: 20 ng cDNA, 0.5 µM of each primer and 1x FastStart SYBR Green Master (Roche, Mannheim, Germany). The following primer sets were used: Dectin-1 5'-TGCTATATCTATTCAGGGGC TCT-3' and 5'-GCAGCACACGATCCTTTCTC-3'; RPL13A: 5'- CGGACCGTGCGAGGTAT -3' and 5'-ACACCTTGAGACGGTCCAGA-3'. All reactions were run at 95°C for 10 min following 40 cycles at 95°C for 10 s, 58°C for 15 s and 72°C for 20 s. Data were analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

## Dectin-1 surface expression by flow cytometry

$5 \times 10^5$  cells were washed twice in 1 ml cold PBS containing 0.5% BSA following incubation with Anti-Dectin-1-antibody (Anti-Dectin-1-PE (FAB1859P) and IgG2b-PE isotype control (IC0041P) from R&D-Systems (Wiesbaden, Germany) in FACS tubes (20 min, 4°C) were used. Cells were washed in 3 ml PBS and finally suspended in 500 µl PBS. measured by flow cytometry using a FACSCalibur using Cell Quest™ software (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany). Signals were averaged using the geometric mean and defined as mean fluorescence intensity (MFI). An isotype control IgG staining for each sample was performed and the signal subtracted from the sample.

## Statistics

Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated using multiple logistic regression analyses. Analyses of risk associations for different polymorphisms were adjusted for sex, cytogenetic risk group (low, intermediate, high), age at diagnosis, white blood count, platelet count and hemoglobin level. Quantitative characteristics were expressed by their median value. Student's t-test (parametric, two-tailed) and chi-square test were used to identify statistical differences when appropriate. The level of significance was considered to be statistically significant with a p value of  $\leq 0.05$ . All analyses were conducted using the SPSS software package, version 22 (SPSS, Chicago, IL, USA).

## Results

### Frequency of TLR2 and Dectin-1 polymorphisms

Genotyping of the polymorphisms (TLR2 R753Q—rs5743708; Dectin-1 Y238X—rs16910526, Dectin-1—rs3901533; Dectin-1—rs7309123) in 186 adult AML patients revealed different frequencies for these investigated SNPs (S1 Fig). In detail, 12 patients (6.5%) were carriers of the TLR2 R753Q polymorphism. Furthermore, in 19 patients (10.2%) the Dectin-1 Y238X SNP was found. The Dectin-1 SNP rs3901533 T/T genotype could only be detected in six patients (3.2%). Due to the very low frequency of this polymorphism it was excluded from further analysis. In contrast, the Dectin-1 polymorphism rs7309123 G/G genotype was found in 47 of 186 patients (25.3%) and 133 patients (71.5%) were carrier of the genotypes C/G or GG.

All genotype frequencies fulfilled the criteria of Hardy-Weinberg equilibrium (<https://ihg.gsfc.de/ihg/snp.html>).

**Table 2. Subtypes of pneumonia and its SNP-dependent distribution (%).**

	all patients n = 186	TLR2 R753Q rs5743708 n = 12	Dectin-1 Y238X rs16910526 n = 19	Dectin-1 Intron rs7309123 (G/G genotype) n = 47	Dectin-1 Intronrs7309123 (C/G + G/G genotype) n = 133
Pneumonia (including atypical pneumonia)	69 (37%)	10 (83%)	6 (32%)	25 (53%)	58 (44%)
Atypical pneumonia (including pulmonary IFD)	58 (31%)	10 (83%)	6 (32%)	21 (45%)	48 (36%)
Pulmonary IFD*	48 (26%)	7 (58%)	4 (21%)	19 (40%)	40 (30%)
Pulmonary IFD**	9 (5%)	2 (17%)	0 (0%)	5 (11%)	9 (7%)

\* including possible, probable and proven IFD according to the EORTC/MSG criteria

\*\* including only probable and proven IFD according to the EORTC/MSG criteria.

doi:10.1371/journal.pone.0150632.t002

## Occurrence of pneumonia following AML induction chemotherapy

[Table 2](#) summarizes the frequency of different subsets of pneumonia as observed in the cohort of 186 AML patients who received intensive anthracyclin-containing chemotherapy. In detail, 69 patients (37%) developed pneumonia while the majority of these patients fulfilled the criteria of atypical pneumonia as it could be found in 58 of 186 patients (31%).

The analysis of pulmonary fungal infections according to the EORTC/MSG criteria revealed 48 patients (26%) with pulmonary IFD. In detail, possible, probable and proven IFD could be demonstrated in 39, 7 and 2 patients, respectively. Importantly, in two cases mucormycosis was found and confirmed histologically.

## Impact of TLR2 and Dectin-1 polymorphisms on occurrence of pneumonia

[Table 2](#) also demonstrates the frequencies of different subsets of pneumonia dependent on the presence of the TLR2 or one of the investigated Dectin-1 polymorphisms. In detail, 10 out of 12 patients (83%) harboring the TLR2 R753Q SNP developed atypical pneumonia and 7 out of 12 (58%) fulfilled the criteria of IFD (possible, probable or proven). The frequencies of the different types of pneumonia were as follows for patients carrying either genotype G/G or G/G + G/C of the Dectin-1 polymorphism rs7309123: general pneumonia 53% or 44%, atypical pneumonia 45% or 36% and IFD 40% or 30%, respectively.

Multiple logistic regression analysis was performed for the occurrence of developing distinct subsets of pneumonia including pulmonary IFD according to the EORTC/MSG consensus guidelines ([Table 3](#)). Patients harboring either the TLR2 R753Q or the Dectin-1 rs7309123 G/G and G/G + C/G genotype were identified to have a significant higher risk for developing pneumonia in general, as well as atypical pneumonia and even pulmonary IFD. None of the clinical characteristics provided in [Table 1](#) remained statistically significant in this multivariate approach ([Table 1](#)).

In detail, in the TLR2 wild type group pneumonia was documented in 34%, whereas for patients carrying the TLR2 polymorphism the incidence was 83% (OR 9.8; 95% CI 2.1–45.9,  $p = 0.001$ ). The presence of the TLR2 R753Q SNP was also associated with a significantly higher risk for developing atypical pneumonia including pulmonary IFD (OR 13.1; 95% CI 2.8–62.1,  $p = 0.001$  and OR 4.5, 95% CI 1.4–15.1,  $p = 0.014$ , respectively) ([Table 3](#)).

Carriers of the G-allele of the Dectin-1 rs7309123 polymorphism (G/G = 47 and G/G + G/C = 133) revealed a strong association with the risk of developing atypical pneumonia and

pulmonary IFD. In detail, pneumonia was diagnosed in 53% of patients harboring the G/G genotype but only in 32% of patients carrying either C/C or C/G genotypes (OR 2.5; 95% CI 1.2–4.8,  $p = 0.014$ ). Furthermore, G/G genotype of Dectin-1 rs7309123 showed a strong association with risk of atypical pneumonia and pulmonary IFD (45% vs. 27% and 40% vs. 21%). By multiple logistic regression analysis the Dectin-1 rs7309123 G/G genotype represents an independent risk factor for developing atypical pneumonia (OR 2.2; 95% CI 1.1–4.4,  $p = 0.028$ ) and pulmonary IFD (OR 2.6; 95% CI 1.3–5.3,  $p = 0.012$ ) (Table 3). A significant correlation was also observed by comparing G/G + C/G genotype vs. C/C genotype of the Dectin-1 rs7309123 polymorphisms (pneumonia: OR 3.0; 95% CI 1.4–6.2,  $p = 0.004$ ; atypical pneumonia OR 2.4; 95% CI 1.1–5.3,  $p = 0.023$  and pulmonary IFD: OR 2.4; 95% CI 1.1–5.6,  $p = 0.041$ ) (Table 3).

We also provide data for probable and proven IFD only, although we are aware that these results are based on a rather low number of patients (S1 Table). Importantly, the G/G genotype of the Dectin-1 rs7309123 SNP is also significantly associated with the risk of probable and proven IFD. Interestingly, both patients diagnosed with proven IFDs were carriers of the G/G genotype.

We also analyzed the functionally relevant Dectin-1 polymorphism rs16910526 encoding an early stop codon at position 238 (Y238X). There was no correlation between the presence of that stop codon SNP and the occurrence of pneumonia in general (OR 0.8; 95% CI 0.3–2.2,  $p = 0.63$ ). Furthermore, Dectin-1 Y238X did also not affect the frequency of atypical pneumonia (OR 1.1; 95% CI 0.4–3.0,  $p = 0.9$ ) or pulmonary IFD (OR 0.7; 95% CI 0.2–2.5,  $p = 0.65$ ). Thus, there was no association between the stop-coding SNP of Dectin-1 and the occurrence of pneumonia following AML induction chemotherapy.

### Cluster analysis of TLR2 and Dectin-1 rs7309123 polymorphisms

Because of the functional relationship between TLR2 and Dectin-1 we next analyzed if a clustering of AML patients tested positive for the TLR2 R753Q polymorphism or carrying the

**Table 3. Multivariate analyses of the attributable risk of the TLR2 and Dectin-1 polymorphisms.**

Genetic variable	Pneumonia %	OR (95% CI) <i>P</i> value	Atypical Pneumonia %	OR (95% CI) <i>P</i> value	Pulmonary IFD* %	OR (95% CI) <i>P</i> value
TLR2 wild type vs. TLR2 R753Q	34%	9.8 (2.1–45.9)	28%	13.1 (2.8–62.1)	24%	4.5 (1.4–15.1)
rs5743708		0.001		0.001		0.014
Dectin-1 wild type** vs. Dectin-1 Y238X	38%	1.0	31%	0.8	26%	0.7
rs16910526	32%	n.s.	32%	n.s.	21%	n.s.
Dectin-1 C/C + C/G vs. Dectin-1 rs7309123 G/G genotype	32%	2.5 (1.2–4.8)	27%	2.2 (1.1–4.4)	21%	2.6 (1.3–5.3)
Dectin-1 C/C vs. Dectin-1 rs7309123 G/G + C/G genotype	21%	3.0 (1.4–6.2)	19%	2.4 (1.1–5.3)	15%	2.4 (1.1–5.6)
	44%	0.004	36%	0.023	30%	0.041

\* including possible, probable and proven IFD according to the EORTC/MSG criteria

\*\* Dectin-1 wild type was defined as negativity of the Y238X allele.

Abbreviations

OR, odds ratio

CI, confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0150632.t003



**Table 4. Subgroup analysis for TLR2 R753Q and Dectin-1 rs7309123 G/G genotype regarding susceptibility to pneumonia.**

Genetic variable	<i>Pneumonia</i> %	OR (95% CI) <i>P</i> value	<i>Atypical Pneumonia</i> %	OR (95% CI) <i>P</i> value	<i>Pulmonary IFD*</i> %	OR (95% CI) <i>P</i> value
Cohort 1						
TLR2 R753Q or	56%	3.1	48%	2.9	42%	3.1
Dectin-1 rs7309123		(1.6–6.1)		(1.5–5.7)		(1.5–6.3)
G/G genotype		0.001		0.003		0.002
Cohort 2						
TLR2 wild type	30%		25%		19%	
Dectin-1 rs7309123						
C/C + C/G genotype						

## Abbreviations

OR, odds ratio

CI, confidence interval

\* including possible, probable and proven IFD according to the EORTC/MSG criteria.

doi:10.1371/journal.pone.0150632.t004

Dectin-1 SNP rs7309123 G/G genotype might affect the frequency of pneumonia. [Table 4](#) demonstrates the occurrence of pneumonia in general, atypical pneumonia and pulmonary IFD dependent on the carrier status of the different polymorphisms (TLR2 R753Q + Dectin-1 rs7309123 G/G genotype vs TLR2 wild type + Dectin-1 rs7309123 C/C + C/G genotype).

We can demonstrate that the relative risk for developing general, atypical pneumonia or IFD within that functionally related subgroup (cohort 1) is significantly increased. In detail, the odds ratios for the occurrence of pneumonia in general, atypical pneumonia and IFD were 3.1 (95% CI 1.6–6.1,  $p = 0.001$ ), 2.9 (95% CI 1.5–5.7,  $p = 0.003$ ) and 3.1 (95% CI 1.5–6.3,  $p = 0.002$ ), respectively.

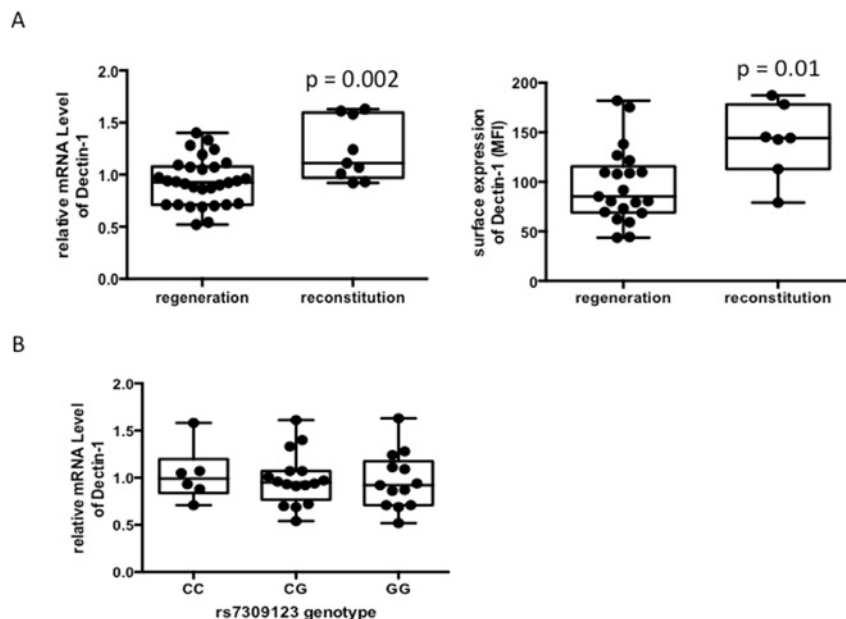
### Analyses of Dectin-1 expression following intensive chemotherapy

Since the effectiveness of immune reconstitution following induction chemotherapy is crucial for host defense against fungal infections we analyzed Dectin-1 mRNA expression of CD14<sup>+</sup> isolated monocytes both during initial hematopoietic regeneration after induction chemotherapy and at complete reconstitution of blood count. mRNA levels were significantly lower during initial hematopoietic regeneration compared to a complete hematopoietic reconstitution prior to consolidation treatment ( $p = 0.002$ ; [Fig 1A](#)). As for Dectin-1 surface expression analysis we excluded Y238X carriers as they are characterized by a reduced cell surface expression ([S2 Fig](#)). Consistent with the mRNA results Dectin-1 surface expression was also reduced during initial regeneration compared to a complete blood count reconstitution ( $p = 0.01$ ; [Fig 1A](#)).

To further understand the clinical impact of the Dectin-1 rs7309123 polymorphism we correlated mRNA expression levels of isolated monocytes. Patients harbouring the risk allele G showed comparable Dectin-1 mRNA levels as patients with the C/C (C/G) genotype ([Fig 1B](#)).

### Discussion

Here, we report the impact of Dectin-1 and TLR2 polymorphisms on susceptibility to different types of pneumonia including pulmonary IFD in patients receiving induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. In our study we could demonstrate a striking correlation between pulmonary infections and individuals that are carriers of the Dectin-1 rs7309123 polymorphism (C/G and G/G). Patients harbouring these genotypes had a two to three times increased



**Fig 1.** A) Correlation between Dectin-1 mRNA and cell surface expression and time following induction chemotherapy. mRNA levels (left) and surface expression (right) of Dectin-1 measured at two time points following induction chemotherapy: at initial regeneration and at complete reconstitution of blood count. Transcript levels and surface expression were analyzed by quantitative PCR and flow cytometry, respectively on isolated monocytes of AML patients at indicated time points. Shown are the results for Dectin-1 mRNA levels of 30 patients at regeneration and 9 at reconstitution ( $p = 0.002$ ) and for Dectin-1 surface expression 21 patients at regeneration and 7 at reconstitution ( $p = 0.01$ ). Y238X carriers were excluded from this analysis. B) No difference in mRNA expression in correlation to Dectin-1 rs7309123 genotype. Expression of Dectin-1 rs7309123 mRNA levels was measured by quantitative PCR. Experiments were performed on isolated monocytes of AML patients. Shown are the results of 6 C/C, 16 C/G and 13 G/G samples, assessed in triplicates.

doi:10.1371/journal.pone.0150632.g001

risk of pneumonia (including IFD) following induction chemotherapy. Due to the low rate of the T/T carrier status of the Dectin-1 SNP rs3901533 statistics for this SNP were only of descriptive manner. In contrast to other studies, no correlation between the Dectin-1 Y238X status and susceptibility to IFD in our cohort was found in our cohort of patients. The Dectin-1 SNP rs16910525 coding for an early stop codon (Y238X) is functionally well studied and has been linked to the occurrence of invasive aspergillosis (IA) in patients after allogeneic transplantation [20]. Two other intronically located SNPs of Dectin-1 (rs3901533 and rs7309123) might also increase the susceptibility to IA after allogeneic stem cell transplantation [12]. The TLR2 SNP rs5743708 coding for an amino acid change R753Q has been linked to increased incidence of tuberculosis, cytomegalovirus (CMV)—disease and other infectious diseases but no association to IFD is known to date [21, 22]. Although minimal changes in cell surface expression of wild type and mutant TLR2 receptor have been described they probably do not contribute to signaling deficiency. Instead, biochemical assays demonstrated that the amino acid change R753Q renders TLR2 signaling by impairing its tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6 and recruitment of Mal and MyD88 [23].

Importantly, all allele frequencies in our report are in concordance with findings from previous studies [12, 24].

Several studies have shown that Dectin-1 and TLR2 act synergistically in recognition and initiation of clearing microbes [13]. Dectin-1 expression enhances TLR2-mediated activation of NF- $\kappa$ B and they collaborate in mediating production of cytokines like interleukins and tumor necrosis factor in response to  $\beta$ -glucan containing particles [25]. Furthermore, TLR2 is



involved in the activation of macrophages that has been described in response to *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* [26]. The cooperation between Dectin-1 and TLR2 has also been shown following mycobacterial infection [27].

The most extensively studied functional polymorphism within the Dectin-1 gene is the Y238X SNP resulting in an early stop codon. Functional relevance of Dectin-1 loss on the cell surface has been shown in individuals carrying homozygous polymorphism of Y238X who developed recurrent vulvovaginal candidiasis [11]. Another study showed an increased incidence of gastrointestinal *Candida* colonization in HSCT recipients that were heterozygous for Y238X [28]. Conflicting data are published on the impact of the Dectin-1 SNP Y238X and the association with IFD in patients with haematological malignancies. In hematopoietic stem cell recipients Cunha et al. could demonstrate that the presence of Y238X is associated with an increased susceptibility to aspergillosis irrespective if the donor or the recipient was carrier of the polymorphism [20]. In contrast, Chai et al. could not show a significant association between the Y238X polymorphism and IA in a comparable clinical setting [29]. In our study on we could not replicate a clinical relevance of the Y238X genotype status for the susceptibility to IFD. Both Cunha et al. and Chai et al. performed their studies on patients who mostly underwent HSCT. Since both donor and recipient genotype influence the function of the immune cells it needs to be discussed if chimerism is actually achieved even at the level of pulmonary macrophages that present one of the most important cells of host defense against infectious pathogens causing pulmonary infections. In contrast, in our study a homogenous patient cohort was analyzed that received a defined induction chemotherapy regime. In the study of Cunha et al. the donor Y238X polymorphism was associated with IA at 36 months following transplantation and after 6 months only a trend could be detected. Observation time in our study ended with discharge of the hospital so that we might miss potential delayed effects of that polymorphism.

Other polymorphisms within the Dectin-1 gene were associated with IA susceptibility as well. Sainz et al. could demonstrate an association between the Dectin-1 SNPs rs3901533 and rs7309123 and the rate of IA in patients with hematologic diseases while most of the patients in this cohort underwent HSCT [12]. This heterogeneous cohort comprised 182 hematological patients including only 68 AML patients.

In our study we could identify G-allele carriers of the Dectin-1 rs7309123 polymorphism to be at an increased risk of pulmonary infections including pulmonary IFD following induction chemotherapy. Sainz et al. found that patients carrying the G/G genotype showed a decreased level of Dectin-1 mRNA expression compared to individuals harbouring the C allele (C/C and C/G) [12]. Although those experiments were performed on a rather small number of samples ( $n = 3$  individuals for G/G genotype) they speculate that the Dectin-1 rs7309123 G allele may disrupt binding sites for potential transcription factors and further speculate that it might have an effect on subsequent immune responses. However, in our analysis Dectin-1 mRNA expression was demonstrated to be equal between different Dectin-1 rs7309123 genotypes. In contrast to the study of Sainz et al. using total RNA, we performed experiments on isolated monocytes that represent the predominant cell population of Dectin-1 surface expression.

Induction of Dectin-1 mRNA results in the production of IL-6, TNF- $\alpha$  and other agents that participate in host defense [20]. Thus we were also interested in potential differences in mRNA expression levels of individuals in our patient cohort at certain time points following chemotherapy. In detail, we compared Dectin-1 mRNA expression and Dectin-1 cell surface of isolated monocytes during ongoing hematopoietic regeneration and at complete restored blood count to assess further reasons of susceptibility to fungal infections besides polymorphisms of the Dectin-1 gene. Indeed, both Dectin-1 mRNA expression and surface expression of monocytes during hematopoietic regeneration was significantly lower compared to the later

time point when the blood count was restored. These data suggest an impaired immune response to fungal pathogens during the time of chemotherapy- induced immunosuppression due to reduced mRNA levels of Dectin-1. Further validation using functional assays is required to support these findings.

As for the TLR2 SNP R753Q which has a prevalence of about 10% in the Caucasian population several studies have reported an association between this polymorphism and the occurrence of infectious events [21, 30]. In this study, the risk of pneumonia and in particular of pulmonary IFD was significantly increased in patients with a TLR2 R753Q polymorphism although we are aware that these results are based on a rather low number of patients heterozygous for that SNP.

In summary, our study represents the first analysis demonstrating that the very frequent G/G and C/G genotypes of the Dectin-1 SNP rs7309123 and the functionally relevant TLR2 SNP R753Q represent important genetic risk factors of developing pneumonia including pulmonary IFD in AML patients undergoing induction chemotherapy. Since we could not reproduce the association of the Dectin-1 Y238X polymorphism and pulmonary IFD it may be considered that the different Dectin-1 SNPs are part of a stronger haplotype and an interaction of different genetic variants may contribute to the susceptibility of infectious events. Gene—gene interactions involving Dectin-1 with CCL2 (CC-chemokine ligand type 2) and CCR2 (CC-chemokine receptor type 2) performed by epistasis analyses suggest the presence of variants that might contribute to the risk of developing IFD [12]. Further studies are needed to demonstrate a broader view of the interaction of different SNPs of the innate immune system and to obtain a more comprehensive picture of the clinical relevance of such polymorphisms.

## Supporting Information

**S1 Fig. SNP frequency.** SNP and genotype frequencies of the TLR2 and Dectin-1 polymorphisms.  
(DOCX)

**S2 Fig. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with reduced Dectin-1 cell surface expression.** Surface Dectin-1 expression of CD14<sup>+</sup> monocytes from wildtype (A/A) or heterozygous (A/C) AML patients for the Dectin-1 Y238X polymorphism. Dectin-1 expression was assessed in 26 WT and 8 Y238X heterozygous individuals ( $p = 0.006$ ). Representative flow cytometry graphs of extracellular Dectin-1 staining are shown.  
(DOCX)

**S1 Table. Multivariate analyses of the attributable risk of the TLR2 and Dectin-1 polymorphisms.** Multivariate analyses of the attributable risk of the TLR2 and Dectin-1 polymorphisms. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.  
(DOCX)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: US SS MF. Performed the experiments: MF BSW SW KS. Analyzed the data: US SS MF. Contributed reagents/materials/analysis tools: BG AG. Wrote the paper: US SS. Supervised the study: US SS. Developed the methodology: MF BSW US SS. Revised the draft manuscript for important intellectual input: AH.

## References

1. Gupta A, Singh M, Singh H, Kumar L, Sharma A, Bakhshi S, et al. Infections in acute myeloid leukemia: an analysis of 382 febrile episodes. *Medical oncology* (Northwood, London, England). 2010; 27(4):1037–45. Epub 2009/10/16. doi: [10.1007/s12032-009-9330-9](https://doi.org/10.1007/s12032-009-9330-9) PMID: [19830601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19830601/).

2. Garcia JB, Lei X, Wierda W, Cortes JE, Dickey BF, Evans SE, et al. Pneumonia during remission induction chemotherapy in patients with acute leukemia. *Annals of the American Thoracic Society*. 2013; 10(5):432–40. Epub 2013/08/31. doi: [10.1513/AnnalsATS.201304-097OC](https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201304-097OC) PMID: [23987587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23987587/); PubMed Central PMCID: PMC3960911.
3. Schrenk KG, Schnetzke U, Stegemann K, von Lilienfeld-Toal M, Hochhaus A, Scholl S. Efficacy of antifungal prophylaxis with oral suspension posaconazole during induction chemotherapy of acute myeloid leukemia. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2015. Epub 2015/03/25. doi: [10.1007/s00432-015-1962-x](https://doi.org/10.1007/s00432-015-1962-x) PMID: [25800622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25800622/).
4. Peterson L, Ostermann J, Rieger H, Ostermann H, Rieger CT. Posaconazole prophylaxis—impact on incidence of invasive fungal disease and antifungal treatment in haematological patients. *Mycoses*. 2013; 56(6):651–8. Epub 2013/05/29. doi: [10.1111/myc.12086](https://doi.org/10.1111/myc.12086) PMID: [23710592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23710592/).
5. Kung HC, Johnson MD, Drew RH, Saha-Chaudhuri P, Perfect JR. Clinical effectiveness of posaconazole versus fluconazole as antifungal prophylaxis in hematology-oncology patients: a retrospective cohort study. *Cancer medicine*. 2014; 3(3):667–73. Epub 2014/03/20. doi: [10.1002/cam4.225](https://doi.org/10.1002/cam4.225) PMID: [24644249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24644249/); PubMed Central PMCID: PMC4101758.
6. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2002; 169(7):3876–82. Epub 2002/09/24. PMID: [12244185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12244185/).
7. Heyl KA, Klassert TE, Heinrich A, Muller MM, Klaile E, Dienemann H, et al. Dectin-1 is expressed in human lung and mediates the proinflammatory immune response to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *mBio*. 2014; 5(5):e01492–14. Epub 2014/08/28. doi: [10.1128/mBio.01492-14](https://doi.org/10.1128/mBio.01492-14) PMID: [25161190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25161190/); PubMed Central PMCID: PMC4173778.
8. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SC, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- $\kappa$ B activation through Raf-1 and Syk. *Nature immunology*. 2009; 10(2):203–13. Epub 2009/01/06. doi: [10.1038/ni.1692](https://doi.org/10.1038/ni.1692) PMID: [19122653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19122653/).
9. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, et al. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*. 2005; 22(4):507–17. Epub 2005/04/23. doi: [10.1016/j.immuni.2005.03.004](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.004) PMID: [15845454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15845454/).
10. Cunha C, Aversa F, Romani L, Carvalho A. Human genetic susceptibility to invasive aspergillosis. *PLoS pathogens*. 2013; 9(8):e1003434. Epub 2013/08/21. doi: [10.1371/journal.ppat.1003434](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003434) PMID: [23950708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23950708/); PubMed Central PMCID: PMC3738488.
11. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spriel AB, Venselaar H, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *The New England journal of medicine*. 2009; 361(18):1760–7. Epub 2009/10/30. doi: [10.1056/NEJMoa0901053](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901053) PMID: [19864674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19864674/); PubMed Central PMCID: PMC2773015.
12. Sainz J, Lupianez CB, Segura-Catena J, Vazquez L, Rios R, Oyonarte S, et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PLoS one*. 2012; 7(2):e32273. Epub 2012/03/03. doi: [10.1371/journal.pone.0032273](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032273) PMID: [22384201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22384201/); PubMed Central PMCID: PMC3288082.
13. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cellular microbiology*. 2008; 10(10):2058–66. Epub 2008/06/14. doi: [10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x) PMID: [18549457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18549457/).
14. Goodridge HS, Underhill DM. Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handbook of experimental pharmacology*. 2008;(183):87–109. Epub 2007/12/12. doi: [10.1007/978-3-540-72167-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-540-72167-3_5) PMID: [18071656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18071656/).
15. Basara N, Schulze A, Wedding U, Mohren M, Gerhardt A, Junghanss C, et al. Early related or unrelated haematopoietic cell transplantation results in higher overall survival and leukaemia-free survival compared with conventional chemotherapy in high-risk acute myeloid leukaemia patients in first complete remission. *Leukemia*. 2009; 23(4):635–40. Epub 2009/01/20. doi: [10.1038/leu.2008.352](https://doi.org/10.1038/leu.2008.352) PMID: [19151786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19151786/).
16. Becker C AH, Krah R, Poenisch W, Wedding U, Fiedler F et al. High complete remission rate in patients with acute myeloid leukemia (AML) above the Age of 60 Years: A Report of the AML97#38 Study of the East German Hematology and Oncology Study Group. *ASH Annu Meet Abstr* 2004. 2004;Abstract 880.
17. Brothman AR, Persons DL, Shaffer LG. Nomenclature evolution: Changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition. *Cytogenetic and genome research*. 2009; 127(1):1–4. Epub 2010/01/30. doi: [10.1159/000279442](https://doi.org/10.1159/000279442) PMID: [20110655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20110655/).


18. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010; 115(3):453–74. Epub 2009/11/03. doi: [10.1182/blood-2009-07-235358](https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358) PMID: [19880497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19880497/).
19. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008; 46(12):1813–21. Epub 2008/05/09. doi: [10.1086/588660](https://doi.org/10.1086/588660) PMID: [18462102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18462102/); PubMed Central PMCID: [PMC2671227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2671227/).
20. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*. 2010; 116(24):5394–402. Epub 2010/09/03. doi: [10.1182/blood-2010-04-279307](https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-279307) PMID: [20807886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20807886/).
21. Lee SO, Brown RA, Kang SH, Abdel-Massih RC, Razonable RR. Toll-like receptor 2 polymorphism and Gram-positive bacterial infections after liver transplantation. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011; 17(9):1081–8. Epub 2011/05/13. doi: [10.1002/lt.22327](https://doi.org/10.1002/lt.22327) PMID: [21563293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21563293/).
22. Kang SH, Abdel-Massih RC, Brown RA, Dierkhising RA, Kremers WK, Razonable RR. Homozygosity for the toll-like receptor 2 R753Q single-nucleotide polymorphism is a risk factor for cytomegalovirus disease after liver transplantation. *The Journal of infectious diseases*. 2012; 205(4):639–46. Epub 2012/01/06. doi: [10.1093/infdis/jir819](https://doi.org/10.1093/infdis/jir819) PMID: [22219347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22219347/); PubMed Central PMCID: [PMC3266129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3266129/).
23. Xiong Y, Song C, Snyder GA, Sundberg EJ, Medvedev AE. R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287(45):38327–37. Epub 2012/09/21. doi: [10.1074/jbc.M112.375493](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375493) PMID: [22992740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22992740/); PubMed Central PMCID: [PMC3488101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3488101/).
24. Schroder NW, Hermann C, Hamann L, Gobel UB, Hartung T, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2003; 81(6):368–72. Epub 2003/05/14. doi: [10.1007/s00109-003-0443-x](https://doi.org/10.1007/s00109-003-0443-x) PMID: [12743710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12743710/).
25. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine*. 2003; 197(9):1107–17. Epub 2003/04/30. doi: [10.1084/jem.20021787](https://doi.org/10.1084/jem.20021787) PMID: [12719479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12719479/); PubMed Central PMCID: [PMC2193968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2193968/).
26. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *The Journal of infectious diseases*. 2002; 185(10):1483–9. Epub 2002/05/07. doi: [10.1086/340511](https://doi.org/10.1086/340511) PMID: [11992285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11992285/).
27. Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 2006; 108(9):3168–75. Epub 2006/07/11. doi: [10.1182/blood-2006-05-024406](https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024406) PMID: [16825490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16825490/); PubMed Central PMCID: [PMC1895517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC1895517/).
28. Plantinga TS, van der Velden WJ, Ferwerda B, van Spriël AB, Adema G, Feuth T, et al. Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009; 49(5):724–32. Epub 2009/07/21. doi: [10.1086/604714](https://doi.org/10.1086/604714) PMID: [19614557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19614557/).
29. Chai LY, de Boer MG, van der Velden WJ, Plantinga TS, van Spriël AB, Jacobs C, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human beta-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *The Journal of infectious diseases*. 2011; 203(5):736–43. Epub 2011/01/19. doi: [10.1093/infdis/jiq102](https://doi.org/10.1093/infdis/jiq102) PMID: [21242599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21242599/); PubMed Central PMCID: [PMC3072717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3072717/).
30. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, et al. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *The European respiratory journal*. 2004; 23(2):219–23. Epub 2004/02/26. PMID: [14979495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14979495/).

## **4.2 Publikation II**

Isoform localization of Dectin-1 regulates the signaling quality of anti-fungal immunity. Fischer, M., J. P. Muller, B. Spies-Weisschart, C. Grafe, O. Kurzai, K. Hunniger, A. Hochhaus, S. Scholl and U. Schnetzke. Eur. J. Immunol., 47(5): 848-859. doi:10.1002/eji.201646849 (2017).

## Research Article

## Isoform localization of Dectin-1 regulates the signaling quality of anti-fungal immunity

Mike Fischer<sup>1</sup>, Jörg P. Müller<sup>2</sup>, Bärbel Spies-Weisshart<sup>1</sup>, Christine Gräfe<sup>1</sup>, Oliver Kurzai<sup>3</sup>, Kerstin Hünninger<sup>3</sup>, Andreas Hochhaus<sup>1</sup>, Sebastian Scholl<sup>1</sup> and Ulf Schnetzke<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Klinik für Innere Medizin II, Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany

<sup>2</sup> Institut für Molekulare Zellbiologie, CMB, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany

<sup>3</sup> Septomics Research Center, Friedrich Schiller University Jena, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans-Knoell-Institute, Jena, Germany

Dectin-1 is recognized as a major receptor for fungal  $\beta$ -glucans and contributes to anti-fungal immunity. Human monocyte populations express Dectin-1 isoforms A and B, which differ by the presence of a stalk region and its N-linked glycosylation site. Here, we analyzed the expression of both isoforms in human monocyte-derived cells. The cellular localization on cell lines stably expressing either Dectin-1 isoform A or B was studied by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. Intracellular protein signaling and cytokine production were analyzed by immunoblotting and cytometric bead array, respectively. Monocyte-derived cells showed cell type-specific expression of the two isoforms. Glycosylated Dectin-1 isoform A was predominantly localized at the cell surface, non-glycosylated isoform B was retained intracellularly. Inhibition of glycosylation resulted in efficient abrogation of cell surface expression of isoform A. Signaling quality following Dectin-1 stimulation was reduced in isoform B cells. Differential isoform specific cytokine secretion was observed by cytometric bead array. We show here that n-glycosylation of Dectin-1 is crucial for its cell surface expression and consequently signal transduction. Taken together, unique cytokine secretion and varying expression levels of human Dectin-1 isoforms on monocyte-derived cells may indicate distinct isoform usage as a cell type-specific mechanism of regulating anti-fungal immunity.

**Keywords:** Cytokine secretion · Dectin-1 isoforms · Fungal diseases · Immune responses · Infectious diseases



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

## Introduction

The incidence of invasive fungal infections (IFI) in hematological patients has substantially increased during the last decades [1, 2].

Prolonged survival of patients with acute leukemia and, especially, advances in supportive care are possible explanations for this increase [3]. In a recent study by Hammond et al., the cumulative incidence of IFI in patients with acute leukemia was 11% at 100 days [4]. IFI therefore represents a clinically relevant cause of morbidity and mortality. Auberger et al. have described an estimated cause-specific mortality of 35% in patients undergoing treatment for hematologic malignancies [5].

**Correspondence:** Dr. Ulf Schnetzke  
e-mail: ulf.schnetzke@med.uni-jena.de



Thus, there is a need for a better understanding of antifungal immunity. In recent years, much effort has been expended in uncovering the mechanisms underlying innate immunity. One of the most intensively studied receptors is Dectin-1, a C-type-lectin receptor which has contributed greatly to our understanding of host-fungal interactions.

The type II transmembrane protein Dectin-1 is the primary receptor on leukocytes for recognition of  $\beta$ -glucan, a carbohydrate present in cell walls of fungal species, and has been shown to be one of the main fungal recognition pathways [6]. Multiple fungal species such as *Candida*, *Pneumocystis*, *Aspergillus*, and *Coccidioides* interact with Dectin-1, as do nonfungal pathogens, notably *Mycobacteria* [7–11].

Dectin-1 is expressed on the cell surface of several human cell types including monocytes, macrophages, neutrophils, and T cells, but also B cells, eosinophils, and mast cells [12–15]. Furthermore, Dectin-1 expression at portals of pathogen entry such as the intestine and lungs contributes to its important role in immune surveillance [12].

Several isoforms of human Dectin-1 have been described as a result of alternative splicing, whereas only two predominant forms - A and B - are able to bind glucan-rich particles [14]. While isoform A is the full-length Dectin-1 protein, a 247 amino acid single transmembrane-spanning protein, isoform B lacks a 46-amino-acid-long stalk region separating the carbohydrate recognition domain (CRD) from the transmembrane domain [14, 16].

Due to the cell type-dependent expression of the two isoforms, it has been postulated that the isoforms may have disparate functions in the regulation of antifungal immunity [14]. Specifically, human isoform A is characterised by an N-linked glycosylation site in its stalk region, whereas, owing to the missing stalk region, isoform B lacks such a glycosylation site [16]. N-linked glycosylation plays an important role in the stabilization and expression of receptors on the cell surface [17]. By using an HEK293-based cell culture model, Kato et al. have shown that in unglycosylated human Dectin-1 isoform B cells, surface (instead isoform B cell surface) expression and  $\beta$ -glucan binding capacity was reduced compared with isoform A [18].

Intracellular signalling of Dectin-1 is transduced via an integral immunoreceptor tyrosine-based (ITAM)-like motif within its cytoplasmic tail. Ligand binding activates both Syk-dependent and -independent signaling cascades. Both pathways induce the production of different cytokines and chemokines (e.g. TNF, CXCL-2, IL-2, and IL-10), but can also activate the respiratory burst and ligand uptake through phagocytosis [7, 8, 19]. Besides triggering those innate immune responses, stimulation of Dectin-1 also activates the adaptive immune system, e.g. in directing the differentiation of T helper 17 (Th17) and T helper 1 (Th1) CD4-positive cells in vitro [20]. Binding of Dectin-1 by fungal  $\beta$ -glucans leads to phosphorylation of the ITAM-like sequence and recruitment of the spleen tyrosine kinase Syk [19]. Subsequently, an activation of the CARD9–Bcl10–MALT1 (CBM) scaffold through PKC $\theta$  is mediated [21]. Moreover, the induction of Syk-independent pathways, such as the Ras-Raf-MEK-ERK cascade, results in the activation of several transcription factors including IRF1, IRF5, and NFAT.

Data presented here delineate the specific characteristics of Dectin-1 isoforms A and B with particular focus on subcellular localization and ligand-binding capacity. Cell lines stably expressing Dectin-1 isoform A or B showed distinct cell surface expression of the Dectin-1 receptor and impact on Zymosan-mediated protein signaling. Unique isoform-dependent cytokine secretion demonstrated by cytometric bead array analyses further emphasizes cell type-specific mechanisms of regulating anti-fungal immunity. This is supported by the observation of diverse isoform expression levels of human monocyte-derived cell populations.

## Results

### Expression levels of Dectin-1 isoforms A and B differ in primary human cells

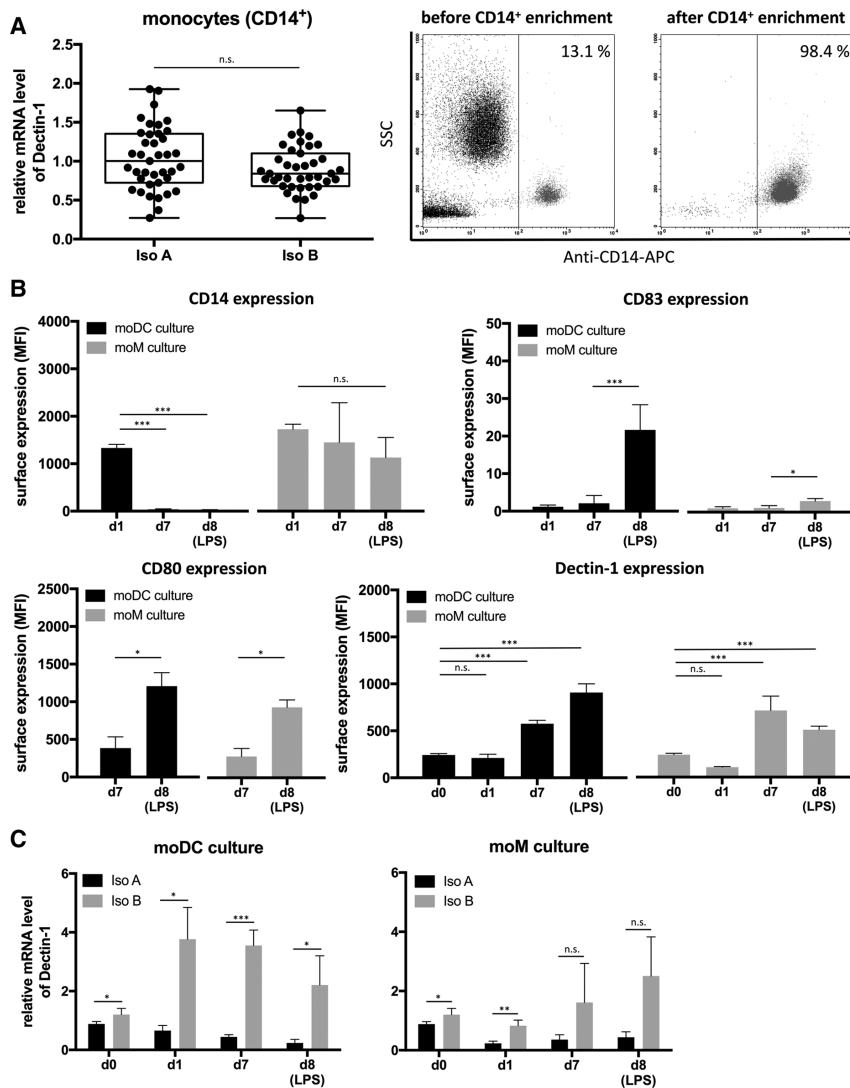
In order to study the in vivo role of Dectin-1 isoforms, expression of isoforms A and B was analyzed in human monocyte-derived cell populations as Dectin-1 appears to be the main receptor for response to fungal pathogens on dendritic cells (moDCs) and macrophages (moMs).

First, we performed a quantitative assessment of RNA transcript levels of Dectin-1 A and B isoforms in CD14-positive purified peripheral blood monocytes from healthy donors ( $n = 39$ ). Both isoforms were readily detected in comparable amounts (Fig. 1A, left). Purity of enriched CD14-positive monocytes was  $95.8 \pm 4.1\%$  assessed by flow cytometry (Fig. 1A, right).

By adding 100 ng/mL rhGM-CSF and either 50 ng/mL rhIL-4 or 50 ng/mL rhGM-CSF to isolated peripheral blood monocytes of three healthy volunteers for 7 days following stimulation with LPS (500 ng/mL) for another 24 h, differentiation into monocyte-derived dendritic cells (moDCs) or macrophages (moMs), respectively, was induced. During cultivation, cell surface markers CD14, CD83, and CD80 were assessed to monitor differentiation and maturation (Fig. 1B). As expected, mature moDCs (day 8) were characterized by a distinct phenotype with a loss of CD14 and upregulation of CD83, a marker molecule for mature DCs following LPS treatment. By contrast, culture of moMs retained cell surface expression of CD14 and showed only little LPS-induced CD83 expression. In addition, CD80 was used as a distinctive marker for both moDC and moM maturation. Total Dectin-1 cell surface expression increased over time in both moDC and moMs (Fig. 1B). Simultaneously, mRNA expression of Dectin-1 isoforms A and B was analyzed by quantitative PCR (Fig. 1C). Freshly isolated monocytes (d0) showed comparable mRNA levels of isoforms A and B. Upon maturation, expression of Dectin-1 isoform B strongly increased, whereas isoform A expression tended to decline during maturation both in moDC and moM cells.

### Whole cell expression of Dectin-1 isoforms A and B

To demonstrate diverse functions of Dectin-1 isoforms, THP-1, and HEK293 cell lines were generated which stably express



**Figure 1.** Characteristics of Dectin-1 expression in monocyte-derived dendritic cells (moDC) and macrophages (moM) in vitro. (A) Human peripheral blood monocytes were magnetically isolated by CD14<sup>+</sup> microbeads ( $n = 39$ , healthy individuals). RNA was isolated and mRNA expression of Dectin-1 isoforms was quantified by an isoform selective qRT-PCR in relation to RPL13A serving as housekeeping gene (left). Data are displayed as box plots. The horizontal line within each box represents the median, the top and bottom equals the 25th and 75th percentile, and the whiskers represent the minimum and maximum values. Each dot represents an individual. The purity of isolated CD14-positive monocytes was assessed by flow cytometry calculating the ratio of CD14-PE labeled cell versus all events (right). Plots are representative of three independent experiments. (B) Magnetically isolated CD14<sup>+</sup> monocytes ( $n =$  three healthy individuals) were cultured and differentiated for 7 days into moDCs and moMs as described in the *Materials and Methods* section. For maturation, cells were stimulated with LPS. Differentiation of monocytes was monitored by measuring the cell surface molecules CD14, CD83, CD80, and Dectin-1 by flow cytometry. (C) Differential expression kinetics of Dectin-1 isoforms A and B mRNA during cultivation and differentiation to moDCs and moMs were analyzed by isoform specific qRT-PCR in relation to the housekeeping gene RPL13A. (B and C) Data are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments. Student's *t*-test and one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was used for calculating statistical significance (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.05$ ; n.s., not significant).

Dectin-1 isoforms A and B. mRNA levels of Dectin A and B were comparable in both cell lines observed by quantitative PCR (Fig. 2A). In addition, whole-cell protein expression levels of both isoforms were equally distributed in relation to RNA expression levels by means of SDS-PAGE and immunoblotting (Fig. 2B). Due to glycosylation of asparagine at amino acid position 91, the protein band of isoform A was detected at approximately 40 kDa instead of the expected 28 kDa calculated by amino acid sequence. The migration of Dectin-1 isoform B at a molecular weight of 21 kDa indicates the absence of glycosylation.

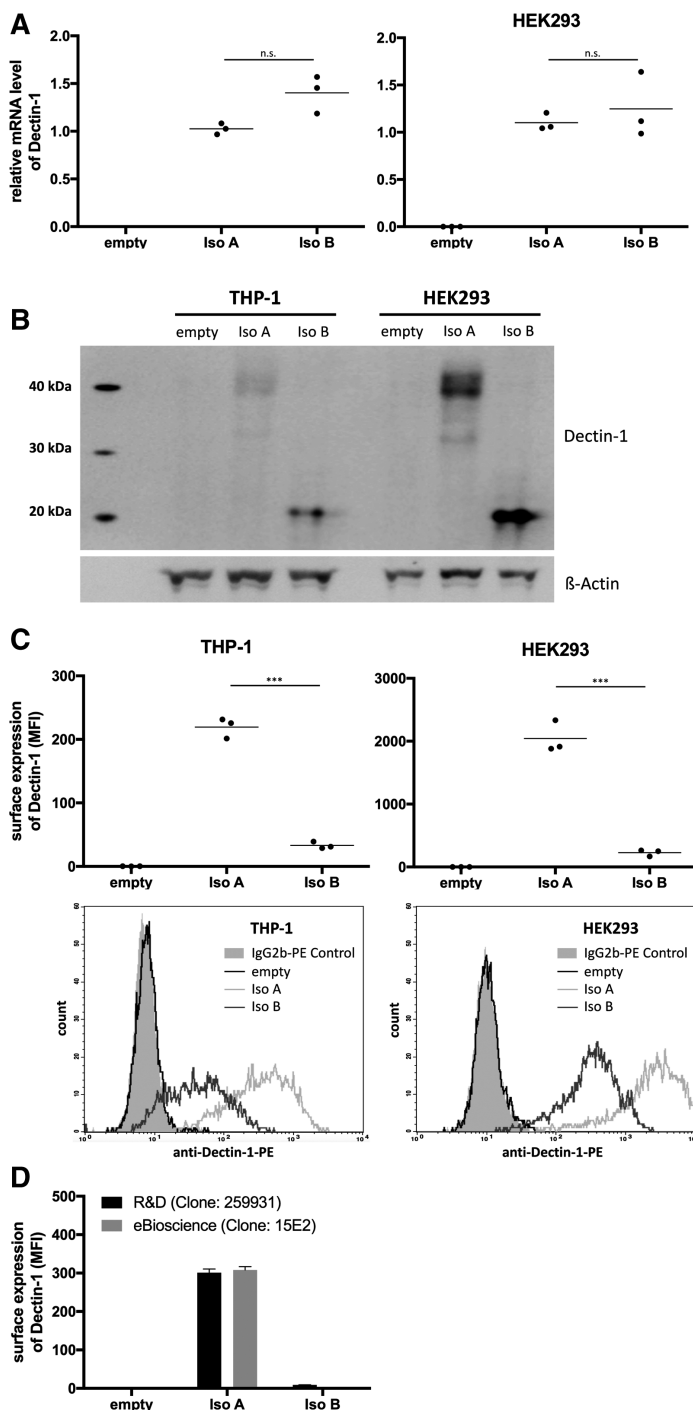
### Distinct subcellular distribution of Dectin-1 isoform A and B in vitro

Analyses of whole cell extracts of the stably transduced cells indicated a similar level of both Dectin-1 isoforms. To elucidate cell surface expression, flow cytometry-based extracellular staining of

Dectin-1 was carried out. Both in THP-1 as well as in HEK293 cells, Dectin-1 isoform A cell surface expression was approximately tenfold higher than that of Dectin-1 isoform B (mean fluorescence intensity of Dectin-1 cell surface staining: THP-1 Dectin-1A vs. Dectin-1B:  $219.4 \pm 9.1$  versus  $33.0 \pm 3.1$ ; HEK293 Dectin-1A versus Dectin-1B:  $2043 \pm 145.5$  versus  $228.2 \pm 29.5$ ) (Fig. 2C). These results were confirmed using a different antibody clone approved for staining of both isoforms independent of the stalk region (Fig. 2D).

To further demonstrate the characteristic subcellular localization of both Dectin-1 isoforms, THP-1 and HEK293 cells were fixed, permeabilized and subsequently stained for Dectin-1 and then subjected to confocal laser scanning microscopy (CLSM). Indeed, CLSM confirmed the accumulation of Dectin-1 isoform A mainly near the cell periphery, which indicates its cell surface localization. In contrast, very little isoform B was detected in the cell envelope (Fig. 3A and B). Consistent with the results acquired by flow cytometry and western blot, CSLM observations in THP-1 and HEK293 support the hypothesis that there is significantly





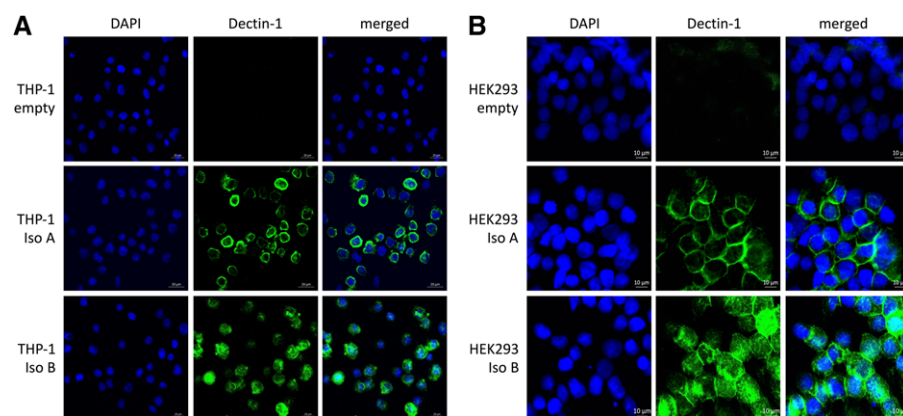
**Figure 2.** Expression of Dectin-1 isoforms A and B in human cell lines. Dectin-1A and -B encoding vectors were stably transduced in both THP-1 and HEK293 cells by a retroviral approach, and Dectin-1 expression was analyzed subsequently. (A) Dectin-1 mRNA expression was analyzed by SYBR green based qRT-PCR in relation to RPL13A serving as housekeeping gene. (B) Dectin-1 protein levels of whole cell protein lysates of indicated cells were analyzed by immunoblotting. A representative blot of three independent experiments is shown. (C) Cell surface expression of Dectin-1 isoforms A and B was quantified by flow cytometry (top). Histogramm plots provide representative data of three independent experiments (bottom). (D) Comparative quantification of Dectin-1 isoforms A and B cell surface expression on THP-1 cells by flow cytometry utilizing Anti-Dectin-1-PE (FAB1859P, Clone 259931, R&D Systems) and an alternative antibody clone (12-9856, Clone 15E2, eBioscience). Identical preanalytics described in the *Materials and Methods* section were used. (A and C) Each dot represents an individual experiment and the horizontal lines indicate. (D) Results are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (\*\*\* $p$  < 0.001; \*\* $p$  < 0.01; \* $p$  < 0.05; n.s., not significant).

less translocation to the cell surface of Dectin-1 isoform B than of isoform A.

### $\beta$ -glucan binding capacity depends on cell surface expression

$\beta$ -glucan binding is crucial for defending fungal pathogens; therefore, the binding capacity of both isoforms was assessed by flow cytometry. Time-dependent kinetics were performed by

incubating both cell lines with 10  $\mu$ g/mL FITC-labeled Zymosan particles at indicated time points (Fig. 4A, top). Results demonstrate that  $\beta$ -glucan binding capacity correlates well with isoform-dependent cell surface expression of Dectin-1. THP-1 and HEK293 cell lines expressing Dectin-1 isoform B showed significantly impaired Zymosan binding compared to the cell lines expressing isoform A. Briefly, after 30 minutes of incubation with Zymosan-FITC,  $14.8 \pm 4.1\%$  of THP-1 Dectin-1 isoform A cells were FITC positive, whereas only  $1.6 \pm 0.6\%$  of Dectin-1B cells were positive (Fig. 4B, bottom). A similar kinetic with HEK293



**Figure 3.** Differential cellular localization of Dectin-1 isoforms A and B imaged by CLSM. (A and B) Subcellular localization of Dectin-1 in (A) THP-1 and (B) HEK293 cell lines stably expressing either Dectin-1 isoform A or B was determined by utilizing confocal laser scanning microscopy. For staining anti-Dectin-1-PE mAb (green, pseudocolor) and DAPI (blue, nuclear counterstain) were used. Scale bars, THP-1 cells 20  $\mu$ M and HEK293 cells 10  $\mu$ M, respectively (magnification,  $\times 40$  objective).

cells confirmed these findings ( $38.0 \pm 4.5\%$  versus  $10.4 \pm 2.3\%$ ). Nevertheless, low-level binding was observed in Dectin-1 isoform B expressing cells.

### N-linked glycosylation of Dectin-1 stalk region controls cell surface localization

In order to prove the impact of N-linked glycosylation of Dectin-1 isoform A on cell surface expression, THP-1 cells were incubated with 10–100 ng/mL Tunicamycin, an inhibitor of N-linked glycosylation. Subsequently, cell surface expression of both Dectin-1 isoforms A and B was assessed by flow cytometry. As demonstrated in Fig. 4B (left), a dose-dependent reduction of cell surface Dectin-1A expression of Tunicamycin-treated cells was observed. In contrast, Dectin-1B cells lacking receptor glycosylation retained their low Dectin-1 expression at a constant level. Furthermore, cellular expression levels of Dectin-1 and deglycosylation of isoform A were monitored using western blot analyses (Fig. 4B, right). Dectin-1B cells maintained a stable protein expression and molecular mass at 21 kDa, whereas Dectin-1A underwent a band shift from 40 to about 35 kDa, indicating the deglycosylation of the protein following Tunicamycin treatment. These data strongly indicate that glycosylation of the stalk region of the Dectin-1A receptor is the prerequisite of cell surface localization.

### Differential downstream signaling of Dectin-1 isoforms

In order to determine  $\beta$ -glucan-mediated differential signaling of the Dectin-1 isoforms, the activation of various characteristic downstream molecules of Dectin-1 isoforms A and B was monitored by western blot analyses using phospho-specific antibodies. THP-1 cells were serum-starved and subsequently incubated with Zymosan depleted, a specific Dectin-1 agonist (Fig. 5). Samples were taken at 30 min and 60 min following stimulation with Zymosan depleted. Syk phosphorylation was observed in both Dectin-1A and -B cells but delayed in isoform B cell strains. Similarly, other important downstream pathways were activated differently: the phosphorylation of  $I\kappa B\alpha$ , an inhibitor of NF- $\kappa$ B, was induced at higher levels in Dectin-1A cells. Further, a

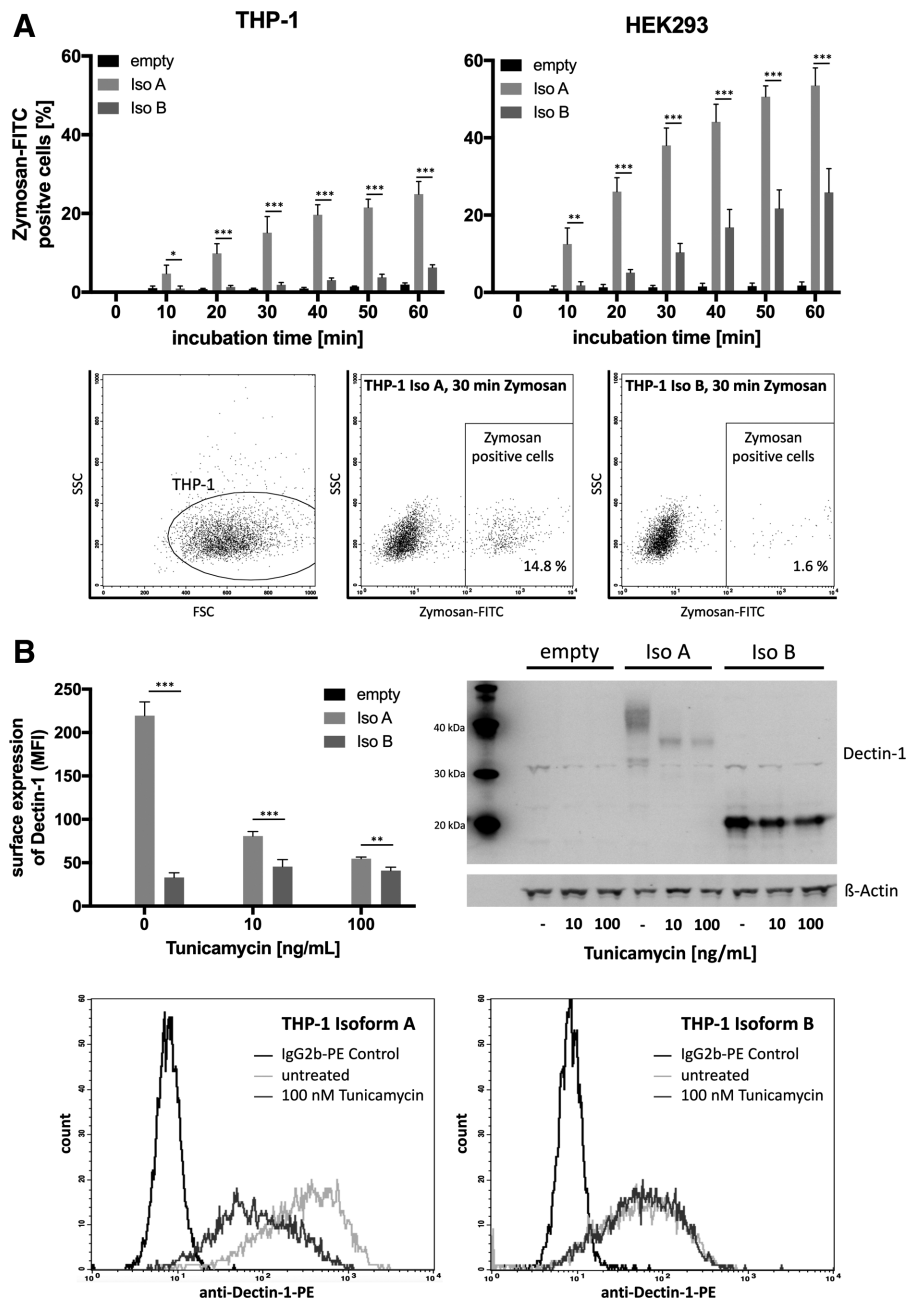
distinct regulation of signaling pathways involving Akt and p38 was observed. Whereas a severe induction of Akt (S473 and T308) and p38 (Thr180/Tyr182) phosphorylation in THP-1 Dectin-1A was observed, THP-1 Dectin-1B cells showed a much lower rate of activation. Mediators of the Ras-Raf-MEK1/2 pathway Raf-1 (Ser338) and pERK1/2 cells showed a strong induction of phosphorylation in Dectin-1A cells, whereas almost no induction was observed in Dectin-1B cells.

### Unique cytokine secretion induced by Dectin-1 isoforms

Dectin-1 induces the production of different proinflammatory cytokines including tumor-necrosis factor (TNF), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and MCP-1 [22]. To assess isoform-specific activation, cytometric bead array experiments were performed on cytokine secretion following Dectin-1 stimulation (Fig. 6). In order to prevent TLR-mediated signaling, THP-1 cells were stimulated with a specific Dectin-1 agonist Zymosan depleted. Inactivated germlings of *Aspergillus fumigatus*, the most common pathogen of IFI in AML patients, were used to determine a potential fungus-specific cytokine profil. Since IFN- $\gamma$  plays an important role in cell priming and activation, IFN- $\gamma$  (50 ng/mL)-preactivated THP-1 cells were used to examine isotype-specific cytokine patterns [23]. Importantly, distinct cytokine secretion was detected for IL-6 and IL-8. Specifically, native and IFN- $\gamma$ -preactivated THP-1 cells expressing isoform A on their cell surface showed a significantly higher secretion of IL-8 than Dectin-1B cells following stimulation of Dectin-1. Interestingly, IFN- $\gamma$ -preactivated Dectin-1B-expressing THP-1 cells produced significantly more IL-6 following both stimulation with Zymosan or *Aspergillus* germlings. Induction of other cytokines (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and MCP-1) was either not significant, or no differences between the two isoforms were detected (data not shown).

### Discussion

The mRNA of the human  $\beta$ -glucan receptor is alternatively spliced into two major isoforms resulting in the synthesis of Dectin-1A



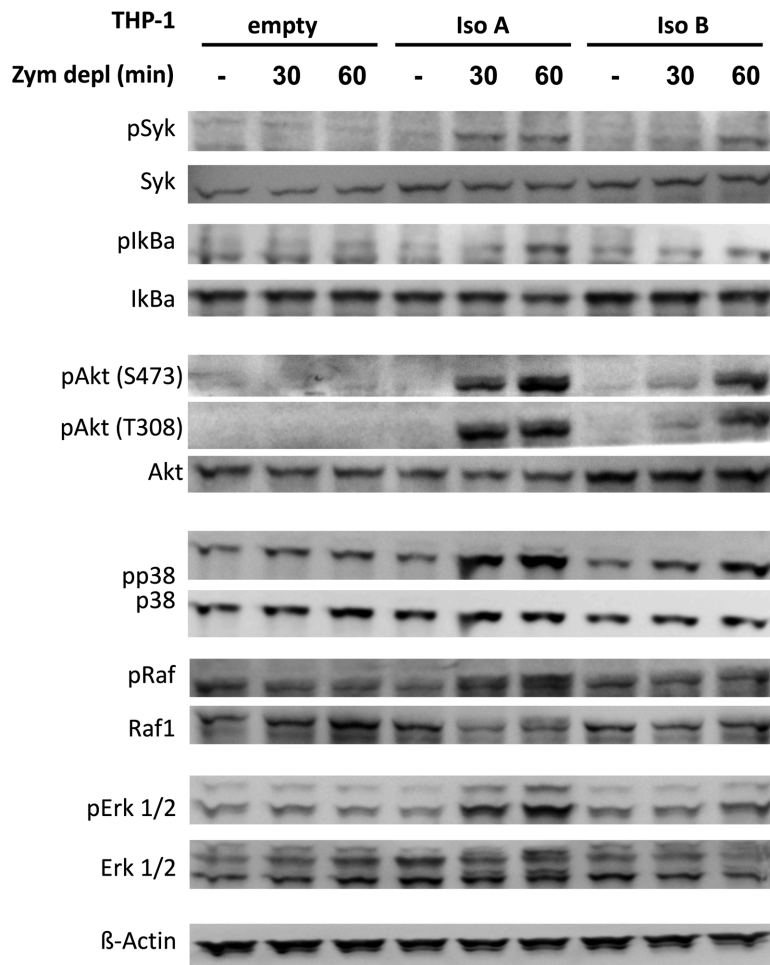
**Figure 4.** Glycosylation-dependent cell surface localization of Dectin-1 isoforms. (A) Binding kinetics of Zymosan-FITC. THP-1 cells stably expressing Dectin-1 isoform A or isoform B were stained with Zymosan-FITC at the indicated time points (top). Zymosan-FITC-positive cells were quantified by flow cytometry. Representative flow cytometric dot plots are provided at 30-min treatment with Zymosan-FITC (bottom). (B) THP-1 cells were treated with indicated concentrations of Tunicamycin. Cell surface expression of Dectin-1 isoforms A and B was quantified by flow cytometry (top, left) and molecular weight of Dectin-1 isoforms of whole cell protein lysates was analyzed by immunoblotting (top, right). For loading control, levels of  $\beta$ -Actin were detected. Histogram plots (bottom) provide representative data of three independent experiments for quantifying surface expression of Dectin-1 by flow cytometry. (A, B) Graphs are shown as mean  $\pm$  SD from three independent experiments. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ; n.s., not significant).

or Dectin-1B. They differ in the presence or absence of a stalk region, respectively [14]. The present study illustrates changes in isoform expression levels on human monocyte-derived dendritic cells and macrophages in vitro. Furthermore, it provides evidence for glycosylation of the stalk region of isoform A as causative for cell surface expression. Protein signaling and cytokine expression analyses of either Dectin-1 isoform A or B stimulated cells elucidate isotype-specific activation of Dectin-1-dependent kinases and cytokine secretion.

Dectin-1 is the primary receptor-mediating host defense against fungal pathogens, and it is primarily expressed on monocytes, macrophages and DCs [24, 25]. Studies of patients harboring a Dectin-1 polymorphism that results in diminished cell surface

expression of Dectin-1 provided definitive evidence of its protective role in fungal disease [26]. Specifically, several research groups demonstrated an impact of a Dectin-1 polymorphism coding for an early stop-codon (Y238X) on colonization with fungal pathogens especially of *Aspergillus spp.* and *Candida spp.* [26, 27]. We and others identified additional Dectin-1 polymorphisms that predispose to fungal infections in hematological patients [28, 29].

In addition to polymorphisms, the Dectin-1 gene is also affected by alternative splicing. Out of the eight human Dectin-1 isoforms, only isoforms A and B function as  $\beta$ -glucan receptors [14]. The major difference between both isoforms seems to be the absent stalk region in isoform B and therefore missing N-linked glycosylation. It has been reported that the amino acid sequence Trp-Ile-His

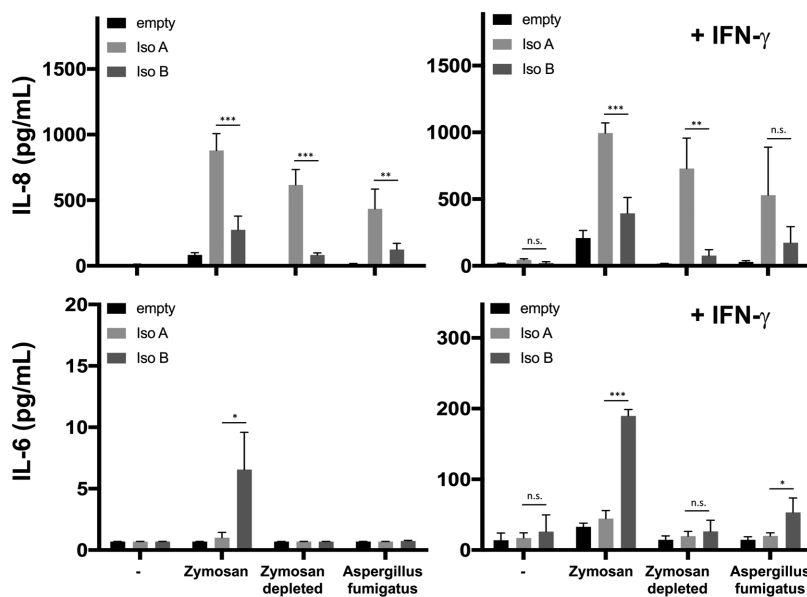


**Figure 5.** Dectin-1 isoform specific activation of signaling pathways. THP-1 cells stably expressing Dectin-1 isoform A or B were serum starved and treated with the specific Dectin-1 agonist Zymosan depleted for indicated time points. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting to evaluate site-specific phosphorylation of indicated signaling proteins. For loading control, levels of  $\beta$ -Actin were detected. A representative blot is shown from three individual experiments.

in the carbohydrate recognition domain of Dectin-1 is essential for recognition of  $\beta$ -glucan [30]. Because human Dectin-1 is mainly expressed on tissue macrophages and DCs that differentiate from blood circulating monocytes, we analyzed the selective regulation of expression of human Dectin-1 isoform A and B during monocyte differentiation *in vitro*. Prior to differentiation of human monocytes into moMs or moDCs, mRNA transcript levels were equally distributed. Both in moMs and in moDCs, the Dectin-1 mRNA level of isoform B increased during maturation; for isoform A either no change or, in some cases, a decrease (moDCs) was detected. Our observation of an upregulation of total Dectin-1 cell surface expression during maturation both in moMs and moDCs suggests that the majority of cell surface Dectin-1 in these human phagocytic cell populations is isoform B. In accordance with our results previous studies of Weck et al. revealed that the major Dectin-1 isoform expressed in human immature mDCs is isoform B [31]. We are aware that mRNA expression does not reflect cell surface expression but consistent with the data by Weck et al. where a downregulation of mRNA expression was shown for all Dectin-1 isoforms following stimulation with the TLR ligand poly I:C, this hypothesis is very suggestive. For a deeper insight into the distinct roles of the two major Dectin-1 isoforms, further experiments were performed on cellular distribution. Data provided above demonstrate that presence of the stalk region and consequently its

glycosylation are requisite for the cell surface localization of the Dectin-1 receptor. As elucidated by confocal laser scanning microscopy as well as by flow cytometry, glycosylated Dectin-1A is localized predominantly on the cell surface membrane, whereas unglycosylated Dectin-1B remained intracellular. Tunicamycin effectively abrogated the specific N-linked glycosylation of isoform A in its stalk region, as confirmed by western blot analyses. This correlates with a drastic decrease of membrane expression of Dectin-1, indicating a pivotal role of glycosylation in cell surface translocation. Impaired cell surface expression of the Dectin-1B receptor had a significant effect on  $\beta$ -glucan binding capacity. However, human Dectin-1B and non-glycosylated mutants of isoform A did not fully lose their ability to bind  $\beta$ -glucan; this might indicate that N-linked glycosylation may not directly affect the binding of  $\beta$ -glucan [18].

The findings in cell surface expression seem contradictory to the data of Heinsbroek et al. where similar expression levels of both isoforms were shown *in vitro* [32]. Those experiments were performed with murine-derived Dectin-1 isoforms A and B. In contrast to the human variants, murine isoforms A and B exhibit equal N-glycosylation sites at their extracellular region. The discrepancy between those findings reinforces dependency of Dectin-1 cell surface expression on its glycosylation status.



**Figure 6.** Dectin-1 isoform-specific induction of cytokines IL-8 and IL-6. THP-1 cells stably expressing Dectin-1 isoform A- or B-expressing cells were either not pre-treated or pre-incubated with IFN- $\gamma$  for 18 h. Subsequently, indicated Dectin-1-agonists were added for 6 h. Supernatants were collected and cytokines were measured with a flow cytometric cytokine bead array. Results shown are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (\*\* $p$  < 0.01; \* $p$  < 0.05; n.s., not significant).

Expression of either one of the Dectin-1 isoforms resulted in a distinct protein signaling and cytokine secretion. Our study revealed remarkable differences in activation of known Syk-dependent and Syk-independent Dectin-1 signaling pathways between the two isoforms [33]. In response to the specific Dectin-1 agonist Zymosan depleted, a hot alkali treated Zymosan to remove all its TLR-stimulating properties, Dectin-1A expressing THP-1 cells showed a much stronger and faster induction of activation of downstream mediators than did those expressing Dectin-1B.

Because Syk has also been linked to PI3K and MAPK activation [34] Akt, p38 and ERK1/2 phosphorylation was analyzed. Agonist-treatment of Dectin-1A expressing THP-1 cells showed a strong induction of phosphorylation of Akt, ERK and p38, while Dectin-1B cells revealed only marginal activation. These data confirmed Dectin-1 isoform dependent protein signaling. Dectin-1 also mediates its activity via NF- $\kappa$ B induction and subsequently results in the production of various cytokines and chemokines responsible for an immune response to fungal infections [35]. Dectin-1 agonist Zymosan depleted mediates phosphorylation and thereby the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , an inhibitor protein of the NF- $\kappa$ B transcription complex. This effect was observed to be more pronounced in Dectin-1A cells than in their counterpart Dectin-1B. In general, there is clearly a correlation between quantity of cell surface expression of the receptor isoform and ability to downstream signaling.

The data provide evidence that Dectin-1 isoforms trigger a distinct cytokine response as demonstrated by flow cytometric bead array experiments. While full-length Dectin-1A induces significantly more IL-8 production upon stimulation with either Zymosan, Zymosan depleted or *Aspergillus* germlings, stalkless Dectin-1B isoform expressing THP-1 cells showed a significantly stronger secretion of IL-6. Although the upregulation of IL-6 following stimulation with Zymosan depleted is statistically not significant, a critical role of the Dectin-1B receptor for induction of

IL-6 could be demonstrated. In detail, no significant IL-6 secretion was detected in non-Dectin-1 expressing control cells (THP-1 empty) following Zymosan treatment; hence no unspecific IL-6 induction, e.g. by TLR-2, was mediated.

These findings are of major importance since the cell surface expression of isoform B is much lower than that of isoform A. The activation of Dectin-1, presumably isoform B, triggers the maturation of DCs and thereby secretion of IL-6 which participates in the polarization of naïve CD4<sup>+</sup> T cells into effector CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> cells [20, 36]. Furthermore, the proinflammatory cytokine IL-6 is crucial for control of the Treg/Th17 balance and macrophage activation [37, 38].

The observation that the induction of IL-6 is specific for isoform B provides an explanation for the selective upregulation of that isoform transcript in human dendritic cells and macrophages since IL-6 plays an important role in T-cell activation.

Cell type-specific roles for Dectin-1 isoforms A and B have been discussed by others: Willment et al. demonstrate that both isoforms are equally functional for  $\beta$ -glucan recognition, but other authors suggest differences in their direct interaction with T cells [14]. One possible explanation proposes the existence of immunological synapses formed between T cells and antigen-presenting cells such as macrophages and DCs [39]. Full-length Dectin-1 receptor isoform A and the stalkless isoform B may interact differently with T cells due to altered receptor properties. Grünebach et al. have shown that Dectin-1B promotes the induction of CD3-positive T cells [40].

Taken together, the data reported here suggest that cell type-specific Dectin-1 isoform expression plays an important role in the regulation of this receptor as a major component in antifungal immune response. Cell surface expression of human Dectin-1 depends on the status of glycosylation at the stalk region. Both major human isoforms are characterized by differential downstream signaling following treatment with components of fungal



cell wall. Importantly, this study demonstrates the specific induction of IL-6 by Dectin-1 isoform B revealing a potential isoform specific mechanism in Dectin-1 antifungal immunity: human dendritic cells and macrophages primarily express isoform B, which causes the secretion of IL-6 following *Aspergillus* challenge.

## Materials and methods

### Cell line cultivation and growth conditions

THP-1 and HEK293 cells as well as the HEK293T packaging cell line were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). THP-1 cells were grown in RPMI 1640 with 2% l-glutamine (Gibco BRL, Wiesbaden, Germany) and 10% heat-inactivated fetal-bovine serum (FCS, Gibco BRL) in a 5% CO<sub>2</sub> air environment and 37°C fully humidified incubator. The day before starting an experiment cells were set up at  $3 \times 10^5$  /mL in fresh culture media. HEK293 and HEK293T cells were maintained in DMEM + 10% FCS under equal conditions.

### Isolation and cultivation of human monocytes

Peripheral blood samples were obtained from healthy donors and collected in EDTA tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque. PBMCs were washed twice with PBS and subsequently monocytes were isolated using CD14 microbeads according to the manufacturer's instruction (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). The purity was quantified by assessing the amount of CD14-APC positive cells by flow cytometry.  $2 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup> monocytes were seeded in 6-well tissue culture plates in 6 mL RPMI containing 10% FCS. To induce differentiation to monocyte-derived dendritic cells (moDCs) 100 ng/mL rhGM-CSF and 50 ng/mL rhIL-4 were supplemented. For generation of macrophages (moMs) 50 ng/mL rhGM-CSF was added and cells were cultured for 7 days followed by stimulation with 500 ng/mL LPS for 24 h.

### Cloning

Human Dectin-1 isoforms were amplified by PCR from human peripheral blood leukocyte cDNA using the following primers: 5'-GTCCACAGACAGTCATCTCA-3' and 5'-CTTGACCTCAGCTGTTACTC-3'. The PCR products were cloned in pcDNA3.1/V5-His-TOPO using the TOPO TA expression kit. Subsequently, the Dectin-1 encoding fragments were subcloned in retroviral expression vector pLXRN (Clontech, Mountain View, CA, USA). Accurate Dectin-1 sequences were confirmed by sequencing the entire insert (Seqlab, Goettingen, Germany).

### Generation of stable cell lines

To obtain cell lines stably expressing Dectin-1 isoforms, a retroviral transduction approach was used. For production of retrovi-

ral particles, HEK293T cells were transfected with pLXRN derivative plasmids encoding Dectin-1 isoform A or B in combination with packaging plasmids pGag/pol and pVGvG. Infection of THP-1 and HEK293 cells was carried out three times in the presence of 8 µg/mL polybrene with the pseudotyped particles every 24 h. Selection of transduced cells with 500 µg/mL G418 was started 48 h after the last transduction over 2 weeks.

### Reagents

Zymosan and the specific Dectin-1 agonist Zymosan depleted were purchased from Invivogen (Toulouse, France) and Zymosan-FITC from Life Technologies (Darmstadt, Germany) and suspended in PBS. Zymosan depleted is a hot alkali treated Zymosan which activates Dectin-1 but has removed all its TLR-stimulating properties. Tunicamycin (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) and LPS (Sigma Aldrich, Munich, Germany) were reconstituted in DMSO. rhGM-CSF, rhIFN-γ, and rhIL-4 (Immunotools, Friesoythe, Germany) were stored in PBS with 0.1% BSA. All reagents were stored at -20°C in aliquots prior to use. *Aspergillus fumigatus* germings (strain: ATCC46645) were kindly provided by Prof. Dr. Oliver Kurzai (Fungal Septomics, Hans-Knöll-Institut, Jena).

### Antibodies

Antibodies against Dectin-1 (#9051), pY525/526-SYK (#2710), SYK (#2712), pS473-AKT (#9271), pT308-AKT (#9275), AKT (#9272), pY180/T182-p38 (#9211), pT202/204-ERK1/2 (#9101), pS338-RAF1 (#9427), pS32-IκBα (#2859), IκBα (#4814), pS536-NF-κB (#3033), rabbit IgG-HRP (#7074), mouse IgG-HRP (#7076) were purchased from Cell Signaling (Frankfurt am Main, Germany). Anti-β-Actin (sc-47778 HRP) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany).

For flow cytometry and LSM-analyses anti-Dectin-1-PE (FAB1859P) and IgG2b-PE isotype control (IC0041P) from R&D-Systems (Wiesbaden, Germany) were used. For result validation an alternative antibody set Anti-Dectin-1-PE (12-9856) with an appropriate IgG2a-PE isotype control (12-4724) were purchased from eBioscience (Frankfurt am Main, Germany). For phenotyping of monocytic-derived cell antibodies against CD83-APC (551073), CD80-PE (340294) and CD14-APC (555399) from Becton-Dickinson (Heidelberg, Germany) were used.

### Immunoblotting

For protein signaling studies, cells were washed with serum-free medium and starved for 2 h in serum-free medium prior to stimulation with 100 µg/mL Zymosan depleted for the indicated times. Cells were lysed in RIPA Buffer prepared according to the manufacturer's protocol (#9806, Cell Signaling). Protein samples (20 µg) were separated on 4–12% Bis-Tris gels with XT-MOPS buffer and transferred to PVDF membrane (all from Bio-Rad, Munich, Germany). Blots were blocked for 1 h in 4% BSA and probed subsequently with the indicated antibodies overnight

at 4 °C. After the incubation with the secondary antibody, the HRP-activity was quantified using enhanced chemiluminescence reagent (Millipore, Darmstadt, Germany). Digital images were taken using the ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare, Solingen, Germany).

### RNA preparation and qRT-PCR analyses

Total RNA was isolated using innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena, Jena, Germany) according to standard protocol. First-strand cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA using M-MLV reverse transcriptase according to manufacturer's protocol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). SYBR green-based analyses were performed using the Mastercycler® ep realplex Real-time PCR System (Eppendorf, Hamburg, Germany). The reaction set up (20 µL) was as follows: 20 ng cDNA, 0.5 µM of each primer and 1× FastStart SYBR Green Master (Roche, Mannheim, Germany). The following primer sets were used: Dectin-1: 5'-TGCTATATCTA-TTCAGGGGCTCT-3' and 5'-GCAGCACACGATCCTTTCTC-3'; RPL13A: 5'-CGGACCGTGCGAGGTAT-3' and 5'-ACACCTTGACACGGTCCAGA-3'. All reactions were carried out at 95°C for 10 min following 40 cycles at 95°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 20 s.

For detection of Dectin-1 isoform specific transcript levels in primary cells, a multiplex PCR method based on TaqMan probes was implemented using the Rotor-Gene Q cycler (Qiagen, Hilden, Germany). The reaction set-up (20 µL) was as follows: 20 ng cDNA, 0.5 µM of each primer, 0.2 µM TaqMan probe and 1× Rotor-Gene Multiplex PCR Mix (Qiagen). The following primer sets and probes were used: Dectin-1A: 5'-TGTGACTCCTACCAAGCTGTCAA-3' and 5'-GGAAGACACTTGTTTACTATAAATCCC-3'; Dectin-1B: 5'-TACCATGGGGGTTCTTTCC-3' and 5'-GGAAGACACTTGTTTACTATAAATCCC-3'; Dectin-1: FAM-ATCTTTAGGAGATTAGAGCCCAGTTGCC-BBQ; RPL13A: Cy5-AACCAAGCGAGGCCAGGC-BBQ. All reactions were run at 95°C for 10 min following 40 cycles at 95°C for 15 s and 62°C for 20 s. Samples were run in triplicate and data were analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method normalizing RNA expression against RPL13A [41].

### Quantification of cell surface molecules by flow cytometry

A  $5 \times 10^5$  cells were washed twice in 1 mL cold PBS containing 0.5% BSA following incubation with fluorochrome conjugated antibody (dilution 1:20) in FACS tubes (20 min, 4°C). Cells were washed with 3 mL PBS and finally suspended in 500 µL PBS measured by flow cytometry using a FACSCalibur and Cell Quest™ software (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany). Signals were averaged using the geometric mean and defined as mean fluorescence intensity (MFI). An isotype control IgG staining for each sample was performed in order to subtract background MFI.

### Cytometric bead array

A  $2.5 \times 10^5$  cells were seeded in 1 mL culture medium under serum conditions. Cells were preincubated with 50 ng/mL IFN-γ for 18 h. Subsequently Dectin-1-agonists were added for a further 6 h (100 µg Zymosan, 100 µg Zymosan depleted,  $1.25 \times 10^6$  *Aspergillus* germLings, respectively). Supernatants were collected and measured with a flow cytometry cytokine bead array approach according to manufacturer's instructions (LEGENDplex™ Human Inflammation Panel Cat. No. 740118, BioLegend, San Diego).

### Zymosan binding assay

A  $2 \times 10^5$  cells were suspended in 200 µL PBS containing 10 µg/mL Zymosan-FITC and incubated at 37°C for the indicated times. Subsequently the cells were chilled on ice and the percentage of Zymosan-FITC positive cells was analyzed by flow cytometry.

### Confocal laser scanning microscopy

Cells were fixed in 4% PFA/PBS and permeabilized in 0.5% Tween-20/PBS. Subsequently, staining of Dectin-1 was performed analogously to flow cytometry. Fluorescence recordings were performed using a confocal laser scanning microscope (LSM 510; Carl Zeiss, Jena, Germany) connected to an inverted microscope (Axiovert 135; Carl Zeiss, Jena, Germany). For image-processing the Software ZEN (Carl Zeiss) was used.

### Statistics

Two-tailed Student's *t*-test was used for statistical analyses and *p* values < 0.05 were considered statistically significant (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001). One-way ANOVA analysis followed by Dunnett's multiple comparison test was used to compare three or more variables. Statistical analyses were performed using Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Unless otherwise indicated, data points represent the mean value and standard deviation of three biological triplicates.

**Acknowledgements:** This work was supported by the "Förderprogramm Infektiologie 2013" as a grant from Gilead (Munich, Germany).

**Conflict of interest:** The authors have declared no conflict of interest.

## References

- Bow, E. J., Considerations in the approach to invasive fungal infection in patients with haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 2008. **140**: 133–152.
- Nucci, M. and Anaissie, E., How we treat invasive fungal diseases in patients with acute leukemia: the importance of an individualized approach. *Blood* 2014. **124**: 3858–3869.
- Leventakos, K., Lewis, R. E. and Kontoyiannis, D. P., Fungal infections in leukemia patients: how do we prevent and treat them? *Clin. Infect. Dis.* 2010. **50**: 405–415.
- Hammond, S. P., Marty, F. M., Bryar, J. M., DeAngelo, D. J. and Baden, L. R., Invasive fungal disease in patients treated for newly diagnosed acute leukemia. *Am. J. Hematol.* 2010. **85**: 695–699.
- Auberger, J., Lass-Flörl, C., Ulmer, H., Nogler-Semenitz, E., Clausen, J., Gunsilius, E., Einsele, H. et al., Significant alterations in the epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Int. J. Hematol.* 2008. **88**: 508–515.
- Hardison, S. E. and Brown, G. D., C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat. Immunol.* 2012. **13**: 817–822.
- Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. and Gordon, S., Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.* 2003. **197**: 1119–1124.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M. and Underhill, D. M., Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 2005. **24**: 1277–1286.
- Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L. and Marr, K. A., Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J. Immunol.* 2006. **176**: 3717–3724.
- Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S. H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K. et al., Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat. Immunol.* 2007. **8**: 39–46.
- Yadav, M. and Schorey, J. S., The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 2006. **108**: 3168–3175.
- Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. and Wong, S. Y., The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* 2002. **169**: 3876–3882.
- Olynych, T. J., Jakeman, D. L. and Marshall, J. S., Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1-dependent mechanism. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2006. **118**: 837–843.
- Willment, J. A., Gordon, S. and Brown, G. D., Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* 2001. **276**: 43818–43823.
- Willment, J. A., Marshall, A. S., Reid, D. M., Williams, D. L., Wong, S. Y., Gordon, S. and Brown, G. D., The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**: 1539–1547.
- Yokota, K., Takashima, A., Bergstresser, P. R. and Ariizumi, K., Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1. *Gene* 2001. **272**: 51–60.
- Helenius, A. and Aebi, M., Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 2004. **73**: 1019–1049.
- Kato, Y., Adachi, Y. and Ohno, N., Contribution of N-linked oligosaccharides to the expression and functions of beta-glucan receptor, Dectin-1. *Biol. Pharm. Bull.* 2006. **29**: 1580–1586.
- Underhill, D. M., Rossmagle, E., Lowell, C. A. and Simmons, R. M., Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 2005. **106**: 2543–2550.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E. et al., Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 2007. **8**: 630–638.
- Drummond, R. A. and Brown, G. D., Signalling C-type lectins in antimicrobial immunity. *PLoS Pathog.* 2013. **9**: e1003417.
- Vautier, S., MacCallum, D. M. and Brown, G. D., C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. *Cytokine* 2012. **58**: 89–99.
- Segura, M., Vadeboncoeur, N. and Gottschalk, M., CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clin. Exp. Immunol.* 2002. **127**: 243–254.
- Brown, G. D., Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, J. A., Williams, D. L., Martinez-Pomares, L., Wong, S. Y. et al., Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 2002. **196**: 407–412.
- Rogers, N. C., Slack, E. C., Edwards, A. D., Nolte, M. A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D. L. et al., Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 2005. **22**: 507–517.
- Cunha, C., Di Ianni, M., Bozza, S., Giovannini, G., Zagarella, S., Zelante, T., D'Angelo, C. et al., Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood* 2010. **116**: 5394–5402.
- Plantinga, T. S., van der Velden, W. J., Ferwerda, B., van Spriël, A. B., Adema, G., Feuth, T., Donnelly, J. P. et al., Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 2009. **49**: 724–732.
- Sainz, J., Lupianez, C. B., Segura-Catena, J., Vazquez, L., Rios, R., Oyonarte, S., Hemminki, K. et al., Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PLoS One* 2012. **7**: e32273.
- Fischer, M., Spies-Weisschart, B., Schrenk, K., Gruhn, B., Wittig, S., Glaser, A., Hochhaus, A. et al., Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 predispose to invasive fungal disease in patients with acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2016. **11**: e0150632.
- Adachi, Y., Ishii, T., Ikeda, Y., Hoshino, A., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S. et al., Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect. Immun.* 2004. **72**: 4159–4171.
- Weck, M. M., Appel, S., Werth, D., Sinzger, C., Bringmann, A., Grunebach, F. and Brossart, P., hDectin-1 is involved in uptake and cross-presentation of cellular antigens. *Blood* 2008. **111**: 4264–4272.
- Heinsbroek, S. E., Taylor, P. R., Rosas, M., Willment, J. A., Williams, D. L., Gordon, S. and Brown, G. D., Expression of functionally different dectin-1 isoforms by murine macrophages. *J. Immunol.* 2006. **176**: 5513–5518.
- Brown, G. D., Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. **6**: 33–43.
- Shah, V. B., Ozment-Skelton, T. R., Williams, D. L. and Keshvara, L., Vav1 and PI3K are required for phagocytosis of beta-glucan and subsequent superoxide generation by microglia. *Mol. Immunol.* 2009. **46**: 1845–1853.



- 35 Plato, A., Willment, J. A. and Brown, G. D., C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int. Rev. Immunol.* 2013. **32**: 134–156.
- 36 Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F., Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 2007. **8**: 942–949.
- 37 Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A. L., Awasthi, A., Dardalhon, V. A., Galileos, G., Vollmar, P. et al., IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. **105**: 18460–18465.
- 38 Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. and Palucka, A. K., IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* 2000. **1**: 510–514.
- 39 Alarcon, B., Mestre, D. and Martinez-Martin, N., The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* 2011. **133**: 420–425.
- 40 Grunebach, F., Weck, M. M., Reichert, J. and Brossart, P., Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp. Hematol.* 2002. **30**: 1309–1315.
- 41 Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001. **25**: 402–408.

**Abbreviations:** MFI: mean fluorescence intensity · moDC: monocyte-derived dendritic cell · moM: monocyte-derived macrophage · SD: standard deviation

**Full correspondence:** Dr. Ulf Schnetzke, Klinik für Innere Medizin II, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Germany  
Fax: +49-3641-9324202  
e-mail: ulf.schnetzke@med.uni-jena.de

Received: 4/12/2016  
Revised: 8/2/2017  
Accepted: 14/3/2017  
Accepted article online: 16/3/2017

## 5 Diskussion

Die vorliegende Dissertation besteht aus zwei Abschnitten, wobei der erste klinische Teil den Zusammenhang von Polymorphismen der Rezeptoren Dectin-1 und TLR2 mit invasiven Pilzinfektionen bei Patienten mit AML nach Induktionschemotherapie untersucht. Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Biologie von Dectin-1, insbesondere der differentiellen Expression und Funktionalität der beiden Hauptisoformen A und B.

Patienten mit akuter myeloischer Leukämie weisen aufgrund der Erkrankung per se, aber auch infolge der sich anschließenden intensiven Chemotherapie ein deutlich erhöhtes Infektionsrisiko auf. Trotz der Fortschritte in der Prophylaxe sowohl gegen bakterielle als auch fungale Erreger stellen Infektionen eine hauptsächliche Ursache für Morbidität und Mortalität infolge der krankheits- und/oder therapiebedingten Leukopeniephase innerhalb dieser Patientengruppe dar. Neben dem Mangel an Abwehrzellen existieren weitere Risikofaktoren für das Auftreten von Infektionen. Polymorphismen von Genen des angeborenen Immunsystems scheinen hier von besonderer Bedeutung (Netea and van der Meer 2011, Cunha, Aversa et al. 2013). Für die Erkennung von Schimmelpilzen (z.B. *Aspergillus fumigatus*) und anderen pathogenen Erregern durch das angeborene Immunsystem spielen Membranrezeptoren (u.a. Dectin-1, Toll-like-Rezeptoren) und lösliche Proteine wie PTX3 oder MBL-2 eine erhebliche Rolle (Granel, Urbano-Ispizua et al. 2006). Das Vorliegen bestimmter genetischer Varianten dieser Moleküle kann mit einem signifikant erhöhten Risiko für invasive Pilzinfektionen (IPI) und Infektionen anderer Genese assoziiert sein. In einer Vorarbeit zu der vorliegenden Dissertation konnten wir zeigen, dass SNPs mit dem Auftreten von septischen Ereignissen und Pneumonien nach Induktionstherapie bei Patienten mit AML assoziiert sind (Schnetzke, Spies-Weisshart et al. 2015).

Für den klinischen Teil der Arbeit wurde in einer retrospektiv angelegten Studie eine Kohorte von 186 AML Patienten genotypisiert und hinsichtlich des Auftretens von invasiven Pilzinfektionen nach Induktionschemotherapie analysiert. Insbesondere wurde hierbei die Anfälligkeit für verschiedene Pneumonieformen, inklusive pulmonaler IPI, untersucht. Das Patientenkollektiv wurde sehr einheitlich ausgewählt. Alle eingeschlossenen Patienten erhielten als Zytostatika Cytarabin und ein Anthrazyklin entsprechend des OSHO-Protokolls (Ostdeutsche Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie). Die Erhebung der klinischen Daten bezüglich des

Auftretens von Pilzpneumonien erfolgte entsprechend der EORTC-/MSG-Kriterien und gewährte einen einheitlichen diagnostischen Standard. Die Genotypisierung des Patientenkollektivs erfolgte mittels TaqMan-PCR auf Basis von zwei 96-Well-Arrays, in denen die gDNA-Proben aller Individuen als Reservoir und auf fixen Positionen. Dies ermöglichte eine Analyse der verschiedenen SNPs mit hohem Durchsatz bei gleichzeitig hoher Zuverlässigkeit der Analysen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Gruppe der Patienten mit homozygotem sowie heterozygotem Genotyp (GG bzw. GC) bezüglich Dectin-1-SNP rs7309123 ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko für pulmonale Infektionen aufweisen, verglichen mit der Gruppe mit CC-Genotyp. Dieser Zusammenhang konnte sowohl für die Ausprägung einer Pneumonie generell sowie pulmonaler IPI demonstriert werden. Die Evidenz dieses Ergebnisses, und insbesondere die Assoziation dieses Polymorphismus mit dem Auftreten von IPI, wird gestützt durch eine Studie von Sainz (Sainz, Lupianez et al. 2012). Hervorzuheben ist jedoch, dass diese, im Gegensatz zur aktuellen Untersuchung, nicht über ein einheitliches Patientenkollektiv oder auch Chemotherapieregime verfügte. Stattdessen wurden Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Grunderkrankungen und zum Teil auch nach Konditionierungstherapie mit anschließender allogener Blutstammzelltransplantation betrachtet. Über die funktionelle Relevanz dieses Polymorphismus, welcher in einer intronischen Region des Dectin-1-Gens liegt, ist bisher wenig bekannt. Spekuliert wird von Sainz und Kollegen ein möglicher Einfluss auf die mRNA-Expression. Eine datenbankgestützte Analyse ergab, dass der SNP innerhalb einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Cdx4 lokalisiert ist. Eine mögliche Enhancer-Funktion wäre denkbar. In der zitierten Arbeit konnte bei Vorliegen des GG Genotyps des Dectin-1 SNP rs7309123 eine signifikant verminderte mRNA-Expression von Dectin-1 im Vergleich zum GC bzw CC Genotyp festgestellt werden. Diese Daten beruhen jedoch auf einer sehr kleinen Fallzahl von 3 Individuen mit dem GG Merkmal. In der vorliegenden Arbeit konnte unter Einbezug einer größeren Fallzahl (CC = 6 Individuen, GC = 16, GG = 13) ein Einfluss des GG-Genotyp von rs7309123 auf die mRNA-Expression von Dectin-1 nicht bestätigt werden. Für die Untersuchung wurden isolierte Monozyten von in Remission befindlichen AML- Patienten verwendet. Ebenso zeichnete sich kein Zusammenhang mit der Dectin-1-Oberflächenexpression auf primären Monozyten ab (Daten nicht gezeigt). In Zusammenschau mit den erhobenen Daten steht ein stichhaltiger Beweis für einen Zusammenhang dieses Polymorphismus mit der Expression von Dectin-1 aus.

Schließlich lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass ein direkter Einfluss des rs7309123-Genotyps auf die Funktion von Dectin-1 eher unwahrscheinlich erscheint. Dennoch weisen die Träger des GG- sowie GC-Genotyps eine erhöhte Anfälligkeit für pulmonale IPI auf. Es ist anzunehmen, dass die Gruppe einen komplexeren Haplotyp aufweist, bei dem weitere genetische Merkmale für das erhöhte Infektionsrisiko verantwortlich sind.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit der Dectin-1-SNP rs16910526 (Y238X) untersucht. Im Gegensatz zu Dectin-1 rs7309123 ist für diesen Polymorphismus eine eindeutige funktionelle Konsequenz für Dectin-1 beschrieben. Der GC-Genotyp codiert für ein vorzeitiges Stop-Codon, Y238X, in einem von beiden Allelen und führt zu einer Reduktion der Proteinexpression auf der Zelloberfläche sowie einer verminderten Zytokinproduktion (Cunha, Di Ianni et al. 2010, Plantinga, Fransen et al. 2010). Mehrere Arbeiten befassten sich bereits mit der Untersuchung der klinischen Relevanz von Dectin-1 Y238X. Die Gruppe um Netea konnte 2009 an hämatologischen Patienten im Kontext einer allogenen Blutstammzelltransplantation zeigen, dass Träger des Dectin-1-Polymorphismus Y238X signifikant häufiger eine Kolonisation mit *Candida* spp. im Gastrointestinaltrakt sowie orofazial aufweisen. Kein Unterschied bot sich im Hinblick auf das Auftreten invasiver Candidämien, wobei die Studie nicht diesbezüglich ausgelegt war. Zudem zeigte sich dieser Polymorphismus mit einer Funktionseinschränkung der in Rekonstitution befindlichen Spenderhämatopoese gegenüber *Candida* (Plantinga, van der Velden et al. 2009). Die potentielle Bedeutung von Dectin-1 Y238X im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation wurde auch von Cunha und Kollegen untersucht. Es wurde gezeigt, dass Y238X mit einem höheren Risiko für eine invasive Aspergillose assoziiert ist. Am deutlichsten waren die Ergebnisse, wenn sowohl Spender als auch Empfänger den Polymorphismus aufwiesen (Cunha, Di Ianni et al. 2010). Andere Arbeiten konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Y238X und dem Auftreten invasiver Pilzinfektionen herstellen. Wiederum in einer anderen Studie der Arbeitsgruppe um Netea wurden 92 Patienten mit invasiver Aspergillose untersucht, welche überwiegend (n=71) eine allogene Stammzelltransplantation erhalten hatten. Dabei hatte der Dectin-1-Polymorphismus keinen Einfluss auf das Auftreten einer invasiven Aspergillose in der Analyse der allogenen transplantierten Patienten. Ein Trend zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber invasiven Aspergillosen wurde bei den nicht-allogenen transplantierten Patienten gesehen, wobei hier die Fallzahl sehr klein war (n=21). Die in der Arbeit durchgeführten

funktionellen Analysen an mononukleären Zellen demonstrierten eine verminderte Immunantwort auf *Aspergillus*, während keine funktionellen Unterschiede für Makrophagen darstellbar waren (Chai, de Boer et al. 2011). Die von dem Y238X-Status unbeeinträchtigte Funktion der Makrophagen, welche in der Lunge eine wichtige Funktion hinsichtlich der Immunantwort auf inhalierte *Aspergillus*-Konidien haben, lässt auf die Bedeutung anderer Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie etwa TLR2 oder TLR4 schließen. In einer weiter oben bereits zitierten Arbeit von Sainz und Kollegen, welche bei 182 hämatologischen Patienten sowohl verschiedene SNPs (unter anderem von Dectin-1) als auch die Expression der korrespondierenden Gene analysierte, konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Y238X und dem Auftreten invasiver Aspergillosen gefunden werden. In dieser Untersuchung waren insgesamt 68 AML-Patienten enthalten. Wie bei den zuvor zitierten Arbeiten und im Gegensatz zur vorliegenden Dissertation wurde ein nicht-einheitliches Patientenkollektiv hinsichtlich Krankheitsentität bzw. Therapiemodalität betrachtet. Für die genannten Studien ist auch hervorzuheben, dass es sich ganz überwiegend um die Charakterisierung von Zellen der Spenderhämatopoese nach Stammzelltransplantation handelt. Klinische Daten zur Bedeutung von Dectin-1 für das Auftreten sowie die Prognose von Pilzinfektionen bei Patienten mit AML und intensiver konventioneller Chemotherapie sind bislang praktisch nicht publiziert.

Die divergenten Ergebnisse, ob eine eingeschränkte Dectin-1-Expression tatsächlich einen unabhängigen Risikofaktor für die Anfälligkeit für invasive Pilzinfektionen darstellen kann, spiegeln sich auch in präklinischen Modellen wieder. Im Gegensatz zu Ergebnissen von Taylor und Kollegen, in denen Dectin-1-defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für die Ausprägung einer Candidiasis aufweisen, konnte eine vergleichbare Studie von Saijo und Kollegen mit einem unabhängigen Dectin-1 Knockout-Mausstamm keinen Zusammenhang zeigen (Saijo, Fujikado et al. 2007, Taylor, Tsoni et al. 2007). Ein weiteres Mausmodell zeigt wiederum eine signifikante Beteiligung von Dectin-1 hinsichtlich des Schutzes vor invasiver pulmonaler Aspergillose (Werner, Metz et al. 2009). Die im Rahmen der Dissertation erhobenen Daten konnten keinen klinischen Zusammenhang zwischen Vorliegen von Y238X und IPI-assoziierten Pneumonien bei AML-Patienten herstellen. Dieses Ergebnis spricht für die funktionell redundante Natur der Immunabwehr von Erregern.

Eingehend untersucht hinsichtlich der Immunantwort gegenüber Pilzinfektionen ist das Zusammenspiel zwischen TLR2 und Dectin-1. Dectin-1 kann die TLR2-vermittelte

Aktivierung von NF- $\kappa$ B verstärken und in der Folge zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Interleukinen führen (Gantner, Simmons et al. 2003). Weiterhin konnte anhand isolierter Makrophagen aus TLR2-Knockout-Mäusen eine Kollaboration beider Rezeptoren infolge der Infektion mit Mykobakterien dargestellt werden (Yadav and Schorey 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Beteiligung des TLR2-SNP rs5743708 hinsichtlich des Auftretens von IPI untersucht. Dieser Polymorphismus liegt in aller Regel heterozygot vor und führt zu einem Aminosäureaustausch (R753Q). Er weist in der kaukasischen Bevölkerung eine Prävalenz von ca. 10 % auf. Funktionell scheint dieser Polymorphismus eine Inhibierung der Tyrosinphosphorylierung von TLR2 zu bewirken. Damit einhergehend wurde eine Verminderung der TLR2/TLR6-Rezeptordimerisierung sowie eine reduzierte Aktivierung von Mal und My88 beobachtet (Xiong, Song et al. 2012). Klinisch angelegte Studien zeigen eine Assoziation mit Cytomegalovirusinfektion sowie Tuberkulose und anderen bakteriellen Infekten (Dalgic, Tekin et al. 2011, Kang, Abdel-Massih et al. 2012). Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführte Untersuchung des TLR2-Polymorphismus stellt die erste Untersuchung an einem AML-Patientenkollektiv dar, welche einen signifikanten Zusammenhang mit einer erhöhten Anfälligkeit für Pneumonien im Allgemeinen sowie pulmonaler IPI und dem Vorliegen von TLR2 R753Q zeigt. Die relativ geringe Fallzahl an heterozygoten Trägern von R753Q (n = 12 aus 186) schränkt die Aussagekraft allerdings ein.

Unabhängig vom Vorliegen bestimmter Dectin-1-Polymorphismen konnte eine signifikante Reduktion der Dectin-1 mRNA-Expression von den im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten während Induktionschemotherapie beobachtet werden. Dies spiegelte sich auch in einer verringerten Membranexpression des Rezeptors dieser Zellen wieder. Obgleich die klinische Relevanz dieser konkreten Beobachtung als gering einzuschätzen ist, zeigt diese exemplarisch einen inhibitorischen Effekt auf die Expression eines Immunrezeptors infolge der Therapie mit Anthrazyklinen bzw. Cytarabin. Interessant ist dieser Aspekt möglicherweise im Hinblick auf den Einfluss auf die Immunkompetenz von Makrophagen. Im Gegensatz zu den eher peripher zirkulierenden Monozyten und Granulozyten, können sie im Therapieverlauf im Gewebe persistieren und stellen somit eine entscheidende residuale Abwehrbarriere dar. Die Ex-vivo-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit waren auf humane Monozyten sowie Granulozyten des peripheren Blutes beschränkt. Die Etablierung eines Untersuchungsregimes auf Basis eines Mausmodells könnte interessante Einblicke

geben. Gewebsmakrophagen könnten hierbei relativ gut über histologische Schnitte visualisiert werden, um entsprechende Effekte in verschiedenen Geweben zu untersuchen.

Neben Polymorphismen im Dectin-1-Gen stellen verschiedene Proteinisoformen weitere Varianten von Dectin-1 dar. Sie sind das Resultat eines alternativen mRNA-Splittings im Rahmen der mRNA-Prozessierung im Zellkern. Die zwei hauptsächlich exprimierten Isoformen sind Dectin-1A und -1B. Nur diese sind membranständig und weisen gleichzeitig eine voll funktionsfähige CRD auf. Strukturbedingt ist somit davon auszugehen, dass nur die Isoformen A und B dazu befähigt sind, eine immunologische Reaktion zu initiieren (Willment, Gordon et al. 2001, Herre, Willment et al. 2004). Um die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Rezeptorvarianten besser zu verstehen, erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit, eine zellbiologische Charakterisierung der beiden Varianten hinsichtlich ihrer Expression in verschiedenen Zellkompartimenten, der Signaltransduktion, des Ligandenbindungsvermögens und der Zytokinfreisetzung. Eine grundlegende Beobachtung hierfür ist eine unterschiedliche Regulation von Isoformen A und B in verschiedenen Blutzellpopulationen. So konnten Expressionsstudien belegen, dass die mRNA von Isoform A und B in Gesamtleukozyten etwa gleich verteilt vorliegt, während speziell in Monozyten sowie Makrophagen das Transkript von B dominiert (Willment, Gordon et al. 2001). Die innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen an CD14-isolierten primären humanen Monozyten zeigen, dass diese zunächst eine vergleichbare mRNA-Expression beider Isoformen aufweisen und im Verlauf ihrer Differenzierung zu Makrophagen sowie dendritischen Zellen, eine selektive Hochregulation von Isoform B-mRNA erfahren. Dieser Zusammenhang konnte auch in einer anderen Studie beobachtet werden, in der die mRNA-Expression von Dectin-1 in *ex vivo* differenzierten dendritischen Zellen analysiert wurde (Weck, Appel et al. 2008). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die selektive Heraufregulation der mRNA-Expression von Dectin-1B infolge der Phagozytendifferenzierung mit einer Erhöhung der Zellmembranexpression von Dectin-1 einhergeht. Auch wenn der verwendete Antikörper keinen spezifischen Nachweis für Isoform B anzeigen kann, so legt die selektive Heraufregulation von Isoform B auf mRNA-Ebene nahe, dass die Erhöhung der Membranexpression durch Isoform B bedingt ist. Die Beobachtungen geben Hinweise auf mögliche unterschiedliche funktionelle

Qualitäten der Dectin-1-Isoformen, welche die differenzierte Regulation ihrer Expression begründen könnten.

Es wurde zunächst die basale Oberflächenexpression von Dectin-1A und -B an retroviral transduzierten Dectin-1-Zellkulturmodellen auf Basis von HEK293- und THP-1-Zellen mittels Immunfluoreszenz durchflusszytometrisch untersucht. In beiden Zellsystemen ergab sich eine etwa zehnmal stärkere Expression in der Plasmazellmembran von Isoform A verglichen mit B. Das Ergebnis konnte unter Verwendung eines alternativen monoklonalen Antikörpers, welcher ebenso eine Spezifität für Isoform A als auch B aufweist, bestätigt werden. Im Gegenzug dazu konnte für beide Isoformen eine vergleichbare gesamtzelluläre Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Über konfokale Laserscanning-Mikroskopie an THP-1- und HEK293-Zellen konnte eine Retention von Isoform B im Zytoplasma dargestellt werden, während in Isoform A exprimierenden Zellen Dectin-1 vordergründig auf der Zelloberfläche nachweisbar war. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Isoform A eine wesentlich stärkere Translokation auf die Plasmamembran erfährt als Isoform B.

Die zusätzliche Halsregion von Isoform A weist zwischen CRD und Transmembrandomäne eine N-Glykosylierung an Asparagin 91 auf. Glykosylierungen sind eine häufige posttranslationale Modifikation von eukaryotischen Proteinen und unter anderem an dessen Stabilisierung sowie Adressierung des Transports in die Zellmembran beteiligt (Helenius and Aebi 2001). Einen ersten ursächlichen Zusammenhang mit der Membranexpression und der Glykosylierung von Dectin-1A wurde von Kato und Kollegen publiziert (Kato, Adachi et al. 2006). Die Gruppe führte über eine gezielte Mutagenese eine Aminosäuresubstitution (Asn91Ala) durch, um die Rezeptorglykosylierung zu unterbinden. Entsprechende Vektoren wurden transient in HEK293 transfiziert und demonstrierten eine reduzierte Oberflächenexpression von unglykosylierten Dectin-1A. Die Untersuchung von Kato und Kollegen zeigte nur einen partiellen Effekt unter Verwendung der embryonalen Nierengewebszelllinie HEK293. Die Verwendung einer leukozytär abgeleiteten Zelllinie als authentischeres Expressionsmodell für Dectin-1 wäre wünschenswert gewesen. Weiterhin ist zu hinterfragen, ob der durchgeführte Aminosäureaustausch per se einen Einfluss auf die Expression des Proteins hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss der Rezeptorglykosylierung von Isoform A anhand eines pharmakologischen Ansatzes mittels Tunicamycin auf Basis der monozytären Zelllinie THP-1 untersucht. Tunicamycin ist ein effektiver Inhibitor der N-



Glykosylierung von Glykoproteinen während deren initialer Prozessierung der zentralen Oligosaccharide im endoplasmatischen Retikulum (Bretthauer 2009). Die durchgeführten Western Blot-Analysen zeigten bereits bei geringen Konzentrationen von Tunicamycin eine deutliche Inhibition der Glykosylierung von Isoform A. Die gesamtzellulär-bezogene Proteinexpression blieb dabei konstant, während sich die Expression auf der Plasmazellmembran drastisch reduzierte und schließlich vergleichbar war mit dem basalen Niveau von Isoform B. Demgegenüber verblieb die Expression von unglykosyliertem Dectin-1B infolge der Tunicamycinbehandlung unbeeinflusst. Die durchgeführten Experimente mit Tunicamycin verdeutlichen aussagekräftig den essentiellen Zusammenhang der spezifischen Glykosylierung von Isoform A mit einer erhöhten Translokation in die Plasmazellmembran. Auf funktioneller Ebene korrelierte die verringerte Oberflächenexpression von Isoform B in HEK293 und THP-1 mit einer reduzierten  $\beta$ -Glucan-Bindungskapazität verglichen mit Isoform A. Zeitkinetische Inkubationen mit Zymosan-FITC als Fluoreszenz-markiertem Dectin-1-Liganden und anschließender durchflusszytometrischer Analyse konnten diesen Zusammenhang verdeutlichen. Ob diese Beobachtungen ausschließlich in der reduzierten Membranexpression von Isoform B begründet liegen oder hierbei ebenso die strukturellen Unterschiede der beiden Varianten einen Einfluss haben, lässt die Untersuchung methodenbedingt offen. Vergangene Analysen legen jedoch nahe, dass beispielsweise die Glykosylierung von Isoform A keinen Einfluss auf die Affinität zu  $\beta$ -Glucanen zeigt (Kato, Adachi et al. 2006). Des Weiteren konnten Adachi und Kollegen über zielgerichtete Mutagenesen von Dectin-1 das  $\beta$ -Glucan-Bindemotiv auf die Region Trp221-Ile222-His223 in der CRD eingrenzen (Adachi, Ishii et al. 2004). Diese Domäne ist bei beiden Isoformen identisch.

Trotz der vergleichsweise geringen basalen Oberflächenexpression von Isoform B und der damit einhergehenden reduzierten Bindungskapazität für  $\beta$ -Glucan in den etablierten Zellkulturmodellen weist diese möglicherweise individuelle Funktionen hinsichtlich der Aktivierbarkeit nachgeschalteter intrazellulärer Proteinsignalwege auf. Denkbar ist auch eine Isoform-selektive Interaktion mit weiteren membranständigen Proteinen oder auch löslichen Faktoren. Auf Basis der Isoform-spezifischen THP-1-Zelllinien wurden vergleichende Untersuchungen zur Aktivierbarkeit verschiedener Dectin-1-assoziiierter Signalmoleküle zwischen Isoform A und B mittels Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Aktivierung von Syk über die hemITAM-Domäne von Dectin-1 spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, Bildung von reaktiven

Sauerstoffspezies und sowie der Phagozytose von Pilzerregern (Underhill, Rossnagle et al. 2005, Gross, Gewies et al. 2006, Plato, Willment et al. 2013). Die Dectin-1-vermittelte Aktivierbarkeit von Syk wurde über den Nachweis der Phosphorylierung der Tyrosinreste an Position 525/526 überprüft. Es zeigte sich dabei eine zeitlich verzögerte Aktivierung in Isoform B-exprimierenden Zellen, welche sich nach 60 Minuten Dectin-1-Stimulation mit „Zymosan depleted“ etwa auf das Niveau von Isoform A-Zellen anglich. Weiterhin konnte eine starke Phosphorylierung der Kinasen Akt, Erk 1/2 und p38 der Isoform A-exprimierenden Zellen und nur eine relativ schwache Aktivierung bei Isoform B-Zellen beobachtet werden. Dectin-1 vermittelt Syk-abhängig die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und führt hierüber zur Produktion einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen (Plato, Willment et al. 2013). Gringhuis und Kollegen beschreiben die Dectin-1-Syk-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Komplexen als eine Überlagerung eines kanonischen sowie nicht-kanonischen Signalweges, resultierend in einer Formierung von transkriptionell aktiven RelA/p50- bzw. RelB/p52-Dimeren (Gringhuis, den Dunnen et al. 2009). Dessen Balance der Aktivität ist maßgeblich von der Aktivierung der Proteinkinase Raf-1 abhängig. Raf-1 führt dabei unter anderem zur Bildung von inaktiven RelB/p65-Dimeren, unterdrückt damit die Aktivität von RelB und es kommt zu einer erhöhten Sezernierung von IL-1 $\beta$ , IL6, IL10, IL12A, IL12p40, IL23A. Die erhobenen Western-Blot-Analysen zeigen eine Dectin-1-vermittelte Phosphorylierung von Raf-1 nur in Isoform A-exprimierenden THP-1-Zellen. Dem gegenüber stand ein nahezu komplettes Fehlen der Aktivierung in Isoform B-Zellen. Möglicherweise ist das stärkere Aktivierungspotential von Raf-1 durch Dectin-1A mit einer veränderten Zytokinexpression verbunden.

Um festzustellen, ob sich neben der Isoform-abhängigen Aktivierbarkeit verschiedener Signalproteine auch Unterschiede in der Zytokinfreisetzung ableiten lassen, wurden die Zellsysteme hinsichtlich ihrer Sezernierung von insgesamt 13 inflammatorisch relevanten Zytokinen untersucht (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-6, IL-8). Für die Aktivierung von Dectin-1 wurde der spezifische Agonist „Zymosan depleted“ verwendet. Ergänzend wurde das Ansprechen auf inaktivierte *Aspergillus fumigatus*-Keimlinge getestet, einer der häufigsten IPI-Erreger bei AML-Patienten. Vor dem Hintergrund, dass bei den verwendeten THP-1-Zellen durch eine Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  eine deutlich stärkere Zytokinduktion beobachtet werden kann, wurden ebenso Konditionen unter Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  mitgeführt (Segura, Vadeboncoeur et al. 2002, Rogers, Williams et al. 2013). Die meisten

der untersuchten Zytokine konnten unter den gewählten Testbedingungen nicht induziert werden. Möglicherweise wirkt hierbei das gewählte Zellmodell limitierend. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Dectin-1-Isoformen ergaben sich jedoch in der Aktivierbarkeit von IL-6 und IL-8. Sowohl naive, als auch IFN- $\gamma$ -präaktivierte Dectin-1A THP-1-Zellen zeigten eine deutlich stärkere Induktion der IL-8-Expression infolge der Stimulation mit „Zymosan depleted“ verglichen mit Isoform B-Zellen. Im Kontrast dazu zeigten Isoform B-exprimierende THP-1-Zellen eine deutlich stärkere Induktion der IL-6-Expression sowohl durch „Zymosan depleted“ also auch unter der Stimulation mit inaktivierten *Aspergillus fumigatus* Keimlingen. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die beiden Dectin-1-Isoformen zu einer unterschiedlichen Aktivierbarkeit von Zytokinen führen können. Insbesondere die Induktion von IL-6 stellte sich in besonderer Weise als selektiv durch Isoform B heraus. Diese Beobachtung ist umso beachtlicher, unter Berücksichtigung der deutlich geringeren Oberflächenexpression von Isoform B verglichen mit A in dem zu Grunde liegenden Zellmodell. IL-6 stellt einen zentralen Aktivator für die Rekrutierung von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen in einen Entzündungsherd dar und bildet damit einen wichtigen Übergang von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort (Jones 2005). Weiterhin ist IL-6 maßgeblich an der Differenzierung von Monozyten zu Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, aber auch Makrophagen beteiligt (Chomarat, Banchereau et al. 2000). Möglicherweise begründet das Vermögen von Dectin-1B eine besonders ausgeprägte Induktion von IL-6 hervorzurufen dessen selektive Hochregulation in differenzierten Phagozyten, so wie es in dieser Arbeit *ex vivo* an Makrophagen sowie dendritischen Zellen gezeigt werden konnte. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Isoform B eine besondere Rolle hinsichtlich der Aktivierung von T-Zellen zukommt. Auch die direkte Interaktion des Plasmamembranrezeptors Dectin-1 mit T-Lymphozyten wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht und diskutiert. So konnte eine spezifische Bindung von His-getaggttem Dectin-1 auf der Oberfläche von T-Zellen sowie deren darauffolgende Anregung zur Proliferation demonstriert werden (Ariizumi, Shen et al. 2000). Zudem wurde gezeigt, dass Dectin-1 die Expression von CD25, CD69 sowie CD154 auf humanen T-Zellen und deren IFN- $\gamma$ -Produktion aktivieren kann (Grunebach, Weck et al. 2002). Inwieweit Dectin-1 Isoform A und B unterschiedliche Qualitäten hinsichtlich der Kostimulation von T-Zellpopulationen aufweisen wurde bislang noch nicht gegenüberstellend untersucht und sollte in zukünftigen Arbeiten aufgeklärt werden. Möglicherweise spielt hierbei auch die extrazelluläre Halsregion von Isoform A eine spezifische Rolle.

## 6 Schlussfolgerungen

Invasive Pilzinfektionen stellen nach wie vor eine hauptsächliche Ursache für Morbidität und Mortalität bei immungeschwächten Patienten dar. Von großem Interesse sind Kenntnisse über die Beziehung zwischen individuellen genetischen Merkmalen und deren Auswirkungen auf die Immunkompetenz. Die durchgeführten Untersuchungen von Polymorphismen des Rezeptors Dectin-1 zeigen insbesondere die Assoziation von Dectin-1 rs7309123 mit einer erhöhten Anfälligkeit für Pilzpneumonien an einem einheitlichen AML-Patientenkollektiv. Die Beobachtung wird bekräftigt durch eine unabhängige Studie mit einem vergleichbaren Kollektiv (Sainz, Lupianez et al. 2012). Der von Sainz und Kollegen propagierte Einfluss des Genotyps von rs7309123 auf die Dectin-1-Expression konnte in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Andere Konsequenzen für die Funktionalität von Dectin-1 erscheinen aufgrund der intronischen Lokalisation des SNP nicht naheliegend. Denkbar ist die Beteiligung eines komplexeren Haplotyps, welcher mit dem „Risikoallel“ von rs7309123 vergesellschaftet ist. In jedem Fall stellt rs7309123 eine deutliche Assoziation mit IPI dar und hat somit prognostisches Potenzial. Es wurde weiterhin der für ein vorzeitiges Stop-Codon codierende Dectin-1-SNP rs16910526 (Y238X) analysiert. Dessen negative Konsequenz für die Funktion des Rezeptors Dectin-1 ist in der Literatur umfassend beschrieben. Dennoch stellt die aktuelle Studienlage dessen klinische Bedeutung in Frage. Die im Rahmen der Dissertation durchgeführte Studie konnte keine Assoziation zwischen Y238X und IPIs darlegen.

Die gewonnenen Erkenntnisse können zu einer besseren Risikostratifikation bei hämatologischen Patienten mit krankheits- bzw. therapiebedingter Abwehrschwäche beitragen. Der Status von Dectin-1 rs7309123 scheint hierbei zwar in einem besonderen Maße prädiktiv bezüglich des Auftretens von IPI zu sein. Jedoch wird die Anfälligkeit für bestimmte Infektionen, neben exogenen Faktoren und mit Ausnahme einiger seltener monogen-bedingter Defekte, letztlich durch die Überlagerung mehrerer bis zahlreicher genetischer Variablen bestimmt. Studien mit ganzheitlichen, genomweiten Analyse- und Auswertemethoden sind daher wünschenswert. Klinische Daten können hierdurch mit einem komplexen genetischen Profil in Korrelation gesetzt werden und sind nicht auf die Betrachtung einzelner, bis weniger SNPs beschränkt. Die immer kostengünstigere SNP-Array-Technik zur simultanen Analyse einer großen Zahl an Polymorphismen gewinnt hierfür stetig an Bedeutung und hat mittelfristig das Potenzial als

Standardverfahren für eine Risikostratifikation hinsichtlich der eingesetzten antiinfektiven Prophylaxe eingesetzt zu werden. Nach wie vor bilden jedoch gezielte Untersuchungen einzelner Polymorphismen sowohl hinsichtlich ihrer klinisch-pathologischen Korrelation als auch *in vitro* auf funktioneller Ebene eine wichtige Grundlage zum Verständnis ihrer Relevanz. In der Literatur findet sich mittlerweile eine große Zahl solcher Studien, in die sich auch die Untersuchung der vorliegenden Dissertation eingliedert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine umfassende, zellbiologische Analyse der beiden Dectin-1-Isoformen A und B vorgenommen. In der Literatur finden sich diesbezüglich nur wenige, vergleichende Untersuchungen. Diese beleuchten nur teilweise und nicht umfassend die unterschiedlichen Qualitäten der beiden Dectin-1-Varianten. Eine wesentliche Erkenntnis aus den durchgeführten Zellkulturmodell-basierten Untersuchungen an THP-1 und HEK293 ist, dass die spezifische N-Glykosylierung in der Halsregion von Isoform A mit einer um ein Vielfaches höheren Expression auf der Plasmamembran verglichen mit Isoform B kausal zusammenhängt. Damit einhergehend zeigten Isoform A-Zellen ein deutlich stärkeres Ansprechen auf  $\beta$ -Glucan, sowohl hinsichtlich ihrer Bindungskapazität als auch in Bezug auf die intrazelluläre Signalweiterleitung. Umso eindrücklicher war die nahezu spezifische Induktion der IL-6-Expression durch Isoform B. Möglicherweise hat Isoform B eine spezifische Rolle für das IL-6-*trans*-signaling im Entzündungsgeschehen und damit für die Aktivierung von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und bildet somit eine wichtige Schnittstelle zwischen der angeborenen und der spezifischen, adaptiven Immunantwort. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen von *ex vivo* differenzierten Monozyten zu Makrophagen- sowie dendritischen Zellphänotypen zeigen eine deutliche und selektive Hochregulation von Isoform B-mRNA im Verlauf der Zelldifferenzierung. Das Zusammenspiel zwischen der Sekretion von IL-6 und der Expression von Dectin-1B sollte in weiteren Studien verfolgt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

Adachi, Y., et al. (2004). "Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1." Infect Immun **72**(7): 4159-4171.

Akira, S., et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Ariizumi, K., et al. (2000). "Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning." J Biol Chem **275**(26): 20157-20167.

Auberger, J., et al. (2008). "Significant alterations in the epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies." Int J Hematol **88**(5): 508-515.

Betts, R., et al. (2006). "Efficacy of caspofungin against invasive Candida or invasive Aspergillus infections in neutropenic patients." Cancer **106**(2): 466-473.

Bhatt, V. R., et al. (2011). "Invasive fungal infections in acute leukemia." Ther Adv Hematol **2**(4): 231-247.

Bodey, G. P. (1966). "Infectious complications of acute leukemia." Med Times **94**(9): 1076-1085.

Bretthauer, R. K. (2009). "Structure, expression, and regulation of UDP-GlcNAc: dolichol phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase (DPAGT1)." Curr Drug Targets **10**(6): 477-482.

Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol **6**(1): 33-43.

Brown, G. D. (2006). "Macrophage receptors and innate immunity: insights from dectin-1." Novartis Found Symp **279**: 114-123; discussion 123-116, 216-119.

Buchner, T., et al. (2005). "Treatment of older patients with AML." Crit Rev Oncol Hematol **56**(2): 247-259.

Chai, L. Y., et al. (2011). "The Y238X stop codon polymorphism in the human beta-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis." J Infect Dis **203**(5): 736-743.

Chomarat, P., et al. (2000). "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages." Nat Immunol **1**(6): 510-514.

Cunha, C., et al. (2013). "Human genetic susceptibility to invasive aspergillosis." PLoS Pathog **9**(8): e1003434.

Cunha, C., et al. (2010). "Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity." Blood **116**(24): 5394-5402.

Dalgic, N., et al. (2011). "Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene from infection to disease in pediatric tuberculosis." Hum Immunol **72**(5): 440-445.

Deschler, B. and M. Lubbert (2006). "Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology." Cancer **107**(9): 2099-2107.

Ferwerda, B., et al. (2009). "Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections." N Engl J Med **361**(18): 1760-1767.

Ferwerda, G., et al. (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." Cell Microbiol **10**(10): 2058-2066.

Fric, J., et al. (2012). "NFAT control of innate immunity." Blood **120**(7): 1380-1389.

Frohling, S., et al. (2005). "Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications." J Clin Oncol **23**(26): 6285-6295.

Gantner, B. N., et al. (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." J Exp Med **197**(9): 1107-1117.

Goodridge, H. S., et al. (2011). "Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'." Nature **472**(7344): 471-475.

Goodridge, H. S., et al. (2009). "Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells." J Immunol **182**(2): 1146-1154.

Goodridge, H. S. and D. M. Underhill (2008). "Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1." Handb Exp Pharmacol(183): 87-109.

Granell, M., et al. (2006). "Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation." Exp Hematol **34**(10): 1435-1441.

Gringhuis, S. I., et al. (2009). "Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk." Nat Immunol **10**(2): 203-213.

Gross, O., et al. (2006). "Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity." Nature **442**(7103): 651-656.

Grunebach, F., et al. (2002). "Molecular and functional characterization of human Dectin-1." Exp Hematol **30**(11): 1309-1315.

Heinsbroek, S. E. M., et al. (2006). "Expression of Functionally Different Dectin-1 Isoforms by Murine Macrophages." The Journal of Immunology **176**(9): 5513-5518.

Helenius, A. and M. Aeby (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." Science **291**(5512): 2364-2369.

Herre, J., et al. (2004). "The role of Dectin-1 in antifungal immunity." Crit Rev Immunol **24**(3): 193-203.

Jones, S. A. (2005). "Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6." J Immunol **175**(6): 3463-3468.

Kang, S. H., et al. (2012). "Homozygosity for the toll-like receptor 2 R753Q single-nucleotide polymorphism is a risk factor for cytomegalovirus disease after liver transplantation." J Infect Dis **205**(4): 639-646.

Kato, Y., et al. (2006). "Contribution of N-linked oligosaccharides to the expression and functions of beta-glucan receptor, Dectin-1." Biol Pharm Bull **29**(8): 1580-1586.

Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-384.

Kohchi, C., et al. (2009). "ROS and innate immunity." Anticancer Res **29**(3): 817-821.

Lin, S. J., et al. (2001). "Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature." Clin Infect Dis **32**(3): 358-366.



Lo-Coco, F., et al. (2013). "Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia." N Engl J Med **369**(2): 111-121.

Menzin, J., et al. (2005). "Excess mortality, length of stay, and costs associated with serious fungal infections among elderly cancer patients: findings from linked SEER-Medicare data." Value Health **8**(2): 140-148.

Michallet, M. and J. I. Ito (2009). "Approaches to the management of invasive fungal infections in hematologic malignancy and hematopoietic cell transplantation." J Clin Oncol **27**(20): 3398-3409.

Murphy, K., et al. (2012). Janeway's immunobiology. New York, Garland Science.

Netea, M. G. and J. W. van der Meer (2011). "Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors." N Engl J Med **364**(1): 60-70.

Pagano, L., et al. (2006). "The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study." Haematologica-the Hematology Journal **91**(8): 1068-1075.

Pagano, L., et al. (2010). "Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: a SEIFEM-2008 registry study." Haematologica **95**(4): 644-650.

Pana, Z. D., et al. (2014). "Host genetics and opportunistic fungal infections." Clin Microbiol Infect **20**(12): 1254-1264.

Pedersen-Bjergaard, J., et al. (2002). "Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities." Leukemia **16**(11): 2177-2184.

Plantinga, T. S., et al. (2010). "Functional consequences of DECTIN-1 early stop codon polymorphism Y238X in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **12**(1): R26.

Plantinga, T. S., et al. (2009). "Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients." Clin Infect Dis **49**(5): 724-732.

Plato, A., et al. (2013). "C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways." Int Rev Immunol **32**(2): 134-156.

Reid, D. M., et al. (2004). "Expression of the beta-glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions." J Leukoc Biol **76**(1): 86-94.

Rogers, H., et al. (2013). "Role of bacterial lipopolysaccharide in enhancing host immune response to *Candida albicans*." Clin Dev Immunol **2013**: 320168.

Rosentul, D. C., et al. (2011). "Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia." J Infect Dis **204**(7): 1138-1145.

Rowley, J. D. and H. J. Olney (2002). "International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: overview report." Genes Chromosomes Cancer **33**(4): 331-345.

Saijo, S., et al. (2007). "Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*." Nat Immunol **8**(1): 39-46.

Sainz, J., et al. (2012). "Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection." PLoS One **7**(2): e32273.

Schaich, M., et al. (2011). "Cytarabine dose of 36 g/m<sup>2</sup> compared with 12 g/m<sup>2</sup> within first consolidation in acute myeloid leukemia: results of patients enrolled onto the prospective randomized AML96 study." J Clin Oncol **29**(19): 2696-2702.

Schnetzke, U., et al. (2015). "Polymorphisms of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) are associated with the risk of infectious complications in acute myeloid leukemia." Genes Immun **16**(1): 83-88.

Schorey, J. S. and C. Lawrence (2008). "The pattern recognition receptor Dectin-1: from fungi to mycobacteria." Curr Drug Targets **9**(2): 123-129.

Segura, M., et al. (2002). "CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2." Clin Exp Immunol **127**(2): 243-254.

Smith, N. L., et al. (2014). "Reduced expression of TLR3, TLR10 and TREM1 by human macrophages in Chronic cavitary pulmonary aspergillosis, and novel associations of VEGFA, DENND1B and PLAT." Clin Microbiol Infect **20**(11): 0960-968.

Takeuchi, O., et al. (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." Int Immunol **13**(7): 933-940.

Takeuchi, O., et al. (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." J Immunol **169**(1): 10-14.

Taylor, P. R., et al. (2007). "Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection." Nat Immunol **8**(1): 31-38.

Underhill, D. M., et al. (2005). "Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production." Blood **106**(7): 2543-2550.

Weck, M. M., et al. (2008). "hDectin-1 is involved in uptake and cross-presentation of cellular antigens." Blood **111**(8): 4264-4272.

Werner, J. L., et al. (2009). "Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*." J Immunol **182**(8): 4938-4946.

Wiederhold, N. P., et al. (2003). "Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies." Pharmacotherapy **23**(12): 1592-1610.

Willment, J. A., et al. (2001). "Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms." J Biol Chem **276**(47): 43818-43823.

Xie, J., et al. (2006). "Human Dectin-1 isoform E is a cytoplasmic protein and interacts with RanBPM." Biochem Biophys Res Commun **347**(4): 1067-1073.

Xiong, Y., et al. (2012). "R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88." J Biol Chem **287**(45): 38327-38337.

Yadav, M. and J. S. Schorey (2006). "The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria." Blood **108**(9): 3168-3175.

## 8 Anhang

### Abbildungen

Abbildung 1: Intrazelluläre Signaltransduktion von Dectin-1 (Modell nach Plato 2013) .....	17
Abbildung 2: Übersicht der humanen Dectin-1-Isoformen .....	19

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich PD Dr. med. Sebastian Scholl sowie Dr. med. Ulf Schnetzke bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben,

ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 20.06.2017

---

Mike Fischer

# Lebenslauf

## I. Persönliche Daten

Name: Mike Fischer  
geboren: 26. Februar 1987, Meiningen  
Nationalität: deutsch

## II. Schulausbildung

09/1997 – 06/2006 Henfling-Gymnasium, Meiningen  
06/2006 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

## III. Hochschulausbildung

10/2006 – 08/2009 Bachelorstudium Biotechnologie, Ernst-Abbe-Fachhochschule, Jena  
03/2009 – 07/2009 Bachelorarbeit zum Thema: *„Verbesserung der Trennung von Tumorzellen von peripherem Blut unter Verwendung magnetischer Nanopartikel“* (Dr. rer. nat. J. H. Clement / Prof. Dr. rer. nat. Werner Reichardt), Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie der Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena  
10/2010 – 05/2013 Masterstudium Pharma-Biotechnologie, Ernst-Abbe-Fachhochschule, Jena  
03/2012 – 04/2013 Masterarbeit zum Thema: *„Einfluss der TNF- $\alpha$ -vermittelten Signalübertragung in FLT3-ITD-positiven Zellmodellen der akuten myeloischen Leukämie“* (PD Dr. med. S. Scholl / Prof. Dr. rer. nat. Michael Meyer), Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie der Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena  
05/2013 Abschluss M.Sc. Pharma-Biotechnologie  
10/2013 – 12/2017 Promotion zum Thema: *„Funktionelle Charakterisierung und prognostische Bedeutung von Dectin-1-Varianten für das Auftreten infektiologischer Komplikationen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie“* (PD Dr. med. S. Scholl / Prof. Dr. rer. nat. Frank Böhmer), Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie der Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena

#### IV. weitere Tätigkeiten

- 08/2009 – 05/2010      wissenschaftlicher Mitarbeiter bei INNOVENT e.V., Jena.  
Projekt: *Verfahrensentwicklung eines berührungsfreien, magnetischen Separationssystems für die ex vivo Abtrennung von Tumorzellen aus peripherem Humanblut.*
- 01/2010 – 11/2011      wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie der Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena. Projekt: *Etablierung eines durchflusszytometrischen Zellsignalassays zum Screening der modulierenden Aktivität von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf MAPK 1/2 in hämatopoetischen Vorläuferzellen von CML-Patienten.*
- 01/2016 – 04/2017      leitender Angestellter MVZ Labor Limbach GmbH, Erfurt  
Fachbereich Hämatologie mit Schwerpunkt in der durchflusszytometrischen Diagnostik.

#### V. veröffentlichte Originalarbeiten

**Fischer, M.**, J. P. Muller, B. Spies-Weisshart, C. Grafe, O. Kurzai, K. Hunniger, A. Hochhaus, S. Scholl and U. Schnetzke (2017). "Isoform localization of Dectin-1 regulates the signaling quality of anti-fungal immunity." Eur J Immunol. **47**(5): 848-859.

**Fischer, M.**, U. Schnetzke, B. Spies-Weisshart, M. Walther, M. Fleischmann, I. Hilgendorf, A. Hochhaus and S. Scholl (2016). "Impact of FLT3-ITD diversity on response to induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia." Haematologica. haematol.2016.157180

**Fischer, M.**, B. Spies-Weisshart, K. Schrenk, B. Gruhn, S. Wittig, A. Glaser, A. Hochhaus, S. Scholl and U. Schnetzke (2016). "Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 Predispose to Invasive Fungal Disease in Patients with Acute Myeloid Leukemia." PLoS One **11**(3): e0150632.

Schnetzke, U., **M. Fischer**, J. J. Frietsch, A. Finkensieper, J. H. Clement, A. Hochhaus and P. La Rosee (2014). "Paradoxical MAPK-activation in response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in CML: flow cytometry loses track." Cytometry B Clin Cytom **86**(4): 229-235.

Schnetzke, U., **M. Fischer**, B. Spies-Weisshart, E. Zirm, A. Hochhaus, J. P. Muller and S. Scholl (2013). "The E3 ubiquitin ligase TRAF2 can contribute to TNF-alpha resistance in FLT3-ITD-positive AML cells." Leuk Res **37**(11): 1557-1564.

Schnetzke, U., **M. Fischer**, A. K. Kuhn, B. Spies-Weisshart, E. Zirm, A. Hochhaus, J. P. Muller and S. Scholl (2013). "The E3 ubiquitin ligase TRAF6 inhibits LPS-induced AKT activation in FLT3-ITD-positive MV4-11 AML cells." J Cancer Res Clin Oncol **139**(4): 605-615.

Schnetzke, U., B. Spies-Weisschart, O. Yomade, **M. Fischer**, T. Rachow, K. Schrenk, A. Glaser, M. von Lilienfeld-Toal, A. Hochhaus and S. Scholl (2015). "Polymorphisms of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) are associated with the risk of infectious complications in acute myeloid leukemia." Genes Immun **16**(1): 83-88.

Jayavelu, A. K., J. P. Muller, R. Bauer, S. A. Bohmer, J. Lassig, S. Cerny-Reiterer, W. R. Sperr, P. Valent, B. Maurer, R. Moriggl, K. Schroder, A. M. Shah, **M. Fischer**, S. Scholl, J. Barth, T. Oellerich, T. Berg, H. Serve, S. Frey, T. Fischer, F. H. Heidel and F. D. Bohmer (2015). "NOX4-driven ROS formation mediates PTP inactivation and cell transformation in FLT3ITD-positive AML cells." Leukemia **30**(2): 473-83.

## **VI. wissenschaftliche Vorträge**

Fischer, M. (2015). "Impact of Dectin-1 polymorphisms on susceptibility of invasive fungal disease in patients with acute myeloid leukemia." Posterpräsentation, 20th Congress of the European Hematology Association, Vienna.

Fischer, M. (2016). "Klinische Bedeutung von TLR- und Dectin-1-Polymorphismen für infektiologische Komplikationen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie." Freier Vortrag, 13. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, Würzburg

Fischer, M. (2016). "Dectin-1-Isoformen bestimmen die beta-Glucan-Bindungsfähigkeit und intrazelluläre Signalübertragung." Freier Vortrag, DGHO Jahrestagung 2016, Leipzig



## Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. Sebastian Scholl für die Möglichkeit diese Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Danken möchte ich ihm für die Heranführung an die hochinteressante Problematik infektiologischer Erkrankungen bei hämatologischen Patienten. Durch seine intensive fachliche Unterstützung erhielt ich die entscheidenden Hinweise zum Fortgang der Untersuchungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Ulf Schnetzke, der meine Arbeit, neben Herrn Dr. Scholl, in großen Teilen mitbetreute und sich stets Zeit nahm mit mir ausführlich Probleme zu diskutieren und damit wesentliche Anstöße für das Fortkommen der Arbeit gab. Auch bin ich ihm für seine unschätzbaren Mühen sich durch meine Texte hindurch zu lesen und seinen äußerst konstruktiven Anmerkungen zur Diskussion der Ergebnisse, sehr dankbar.

Weiterhin danken möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. Jörg P. Müller vom Institut für Molekulare Zellbiologie in Jena (CMB). Bei ihm durfte ich die Methodik der viral-vermittelten Gentransduktion erlernen und durchführen. Darüber hinaus bekam ich von Herrn Dr. Müller viele außergewöhnlich produktive Anregungen zur experimentellen Umsetzung verschiedener zellbiologischer Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. med. A. Hochhaus, Direktor der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Jena danke ich für die Möglichkeit die Doktorarbeit in seiner Klinik durchzuführen und die Vielzahl der zur Verfügung stehenden Labormethoden nutzen zu können.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe des onkologischen Forschungslabors unter Leitung von Herrn Dr. rer. nat. Joachim Clement für ihre Hilfsbereitschaft sowie die unterhaltsame und äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden dafür danken, dass sie mich während der gesamten Promotion unterstützt haben. Ohne sie wäre das alles nicht möglich gewesen.